



EC'D 06 JUN 2002

WIPO

PCT

*Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività
Ufficio Italiano Brevetti e Marchi
Ufficio G2*

Invenzione Industriale

RM12001 A 000210

Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



Smad, fl 1.5 APR. 2002

~~IL DIRIGENTE~~

Aut. Giorgio ROMANI

AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

MODULO A

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

marca
da
bollo

A. RICHIEDENTE (i)

1) Denominazione: **ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'** N.G. **ED**
 Residenza: **Viale Regina Elena, 299 - 00161 ROMA** codice **03657731000**
 2) Denominazione: _____
 Residenza: _____ codice _____

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome: **Dr. ssa Maria Vittoria PRIMICERI ed altri** cod. fiscale _____
 denominazione studio di appartenenza: **NOTARBARTOLO & GERVAZI S.p.A.**
 via: **Savoia** n. **82** città: **ROMA** cap. **00198** (prov.) **RM**

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via: _____ n. _____ città: _____ cap. _____ (prov.) _____

D. TITOLO

classe proposta (naz./est.) _____

gruppo/sottogruppo _____

"Uso degli inibitori della proteasi del virus dell'immunodeficienza umana (HIV) nella terapia del sarcoma di Kaposi, dei tumori e delle malattie angioproliferative, infiammatorie ed autoimmuni, associati e non all'infezione da HIV".

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SÌ ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA ____/____/____ N° PROTOCOLLO _____

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

1) **ENSOLI Barbara** 3) _____
 2) _____ 4) _____

F. PRIORITÀ

nazione e organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato
S/N

1) **nessuna** _____
 2) _____

SCIoglimento RISERVE

Data N° Protocollo

____/____/____
 ____/____/____
 ____/____/____

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICRORGANISMI, denominazione:

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

nessuna

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

Doc. 1) **1** **PROV** n. pag. **44** riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)
 Doc. 2) **1** **PROV** n. tav. **11** disegno (obbligatorio se citato in descrizione; 1 esemplare)
 Doc. 3) **1** **RIS** lettera e incarico procura e riferimento procura generale
 Doc. 4) **1** **RIS** designazione inventore
 Doc. 5) **1** **RIS** documenti di priorità con traduzione in italiano
 Doc. 6) **1** **RIS** autorizzazione e atto di cessione
 Doc. 7) **1** nominativo completo del richiedente

SCIoglimento RISERVE

Data N° Protocollo

____/____/____
 ____/____/____
 ____/____/____

____/____/____
 ____/____/____
 ____/____/____

confronto singola priorità

____/____/____
 ____/____/____
 ____/____/____

8) attestati di versamento, totale lire **Novemcentoquindicimila.**COMPILATO IL: **18/04/2001**FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE (i): **Maria Vittoria PRIMICERI** obbligatorioCONTINUA S/NO: **NO****NOTARBARTOLO & GERVAZI S.p.A.**DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA S/NO **SI**

UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI

VERBALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA

RM 2001 A 000216

SCIAA di ROMA

codice **58**L'anno **Due milauno**il giorno **Diciotto**del mese di **Aprile**Il(i) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato o ha sottoscritto la presente domanda, corredata di n. **00** fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto soprariportato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

IL DEPOSITANTE

Purina KaldenaiUFFICIALE ROGANTE
L'Ufficiale Rogante*Silvia Allert*

2770PTIT

PROSPETTO A

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA

REG. B

DATA DI DEPOSITO

18/04/2001

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

/ /

RM 2001 A 000210

D. TITOLO

"Uso degli inibitori della proteasi del virus dell'immunodeficienza umana (HIV) nella terapia del sarcoma di Kaposi, dei tumori e delle malattie angioproliferative, infiammatorie ed autoimmuni, associati e non all'infezione da HIV".

L. RIASSUNTO

Impiego degli inibitori della proteasi del virus dell'immunodeficienza umana (HIV) (HIV-PI) per utilizzarli come farmaci o per realizzare nuovi farmaci ad azione anti-angiogenica, anti-tumorale, anti-edemigena, anti-infiammatoria, per il trattamento del sarcoma di Kaposi, dei tumori, e delle malattie angioproliferative, infiammatorie ed autoimmuni in soggetti infettati o non con il virus HIV.



M. DISEGNO

WWS

Descrizione

RM 2001 A 000210

della domanda di brevetto per Invenzione Industriale dal titolo: "Uso degli inibitori della proteasi del virus dell'immunodeficienza umana (HIV) nella terapia del sarcoma di Kaposi, dei tumori e delle malattie angioproliferative, infiammatorie ed autoimmuni, associati e non all'infezione da HIV"

a nome di Istituto Superiore di Sanità

con sede in 00161 Roma - Viale Regina Elena, 299

Inventori designati: Barbara ENSOLI

Depositata il . **con il n.**

* * * * *

Campo dell'invenzione

La presente invenzione è relativa all'uso degli inibitori della proteasi del virus dell'immunodeficienza umana (HIV) nella terapia del sarcoma di Kaposi, dei tumori e delle malattie angioproliferative, infiammatorie ed autoimmuni, associati e non all'infezione da HIV.

Arte nota

Gli inibitori della proteasi del virus HIV sono composti ad attività nota e sono ad esempio descritti in Deeks et al. (Deeks et al., 1997). Essi sono impiegati nella terapia dell'infezione da HIV in soggetti affetti dalla sindrome dell'immunodeficienza acquisita (AIDS) con la funzione di inibire la maturazione del virus e bloccarne la replicazione (Deeks et al., 1997). Nel seguito della presente descrizione gli inibitori della proteasi del virus HIV verranno indicati anche con la sigla HIV-PI.

Il sarcoma di Kaposi (KS) è un tumore associato all'infezione da herpesvirus umano 8 (HHV8) ed è particolarmente frequente in soggetti in-

fettati con il virus HIV (AIDS-KS) (Ensoli e Stürzl., 1998; Ensoli et al., in press). Il KS viene osservato anche in soggetti non infettati da HIV, particolarmente nell'area mediterranea ed in Italia (KS classico), in Africa (KS endemico) ed in soggetti trapiantati di organo sottoposti a terapia immunosoppressiva (KS iatrogenico) (Ensoli e Stürzl., 1998; Ensoli et al., in press). La disregolazione del sistema immune appare essere una condizione necessaria allo sviluppo di KS in soggetti infettati con il virus HHV8 (Ensoli e Stürzl., 1998; Ensoli et al., in press).

Diversi autori hanno descritto una ridotta incidenza di KS e di linfomi (International Collaboration on HIV and Cancer, 2000) o regressione (Lebbé et al., 1998; Cattelan et al., 1999) del KS in pazienti infettati da HIV e trattati con combinazioni di farmaci antiretrovirali contenenti almeno un HIV-PI (Deeks et al., 1997). Il KS è un tumore vascolare caratterizzato da angiogenesi, permeabilità vascolare ed edema, crescita di cellule fusate di origine endoteliale (cellule di KS) e da infiltrazione di cellule infiammatorie, ed è particolarmente frequente ed aggressivo in maschi omosessuali e bisessuali infettati con HIV e co-infettati dall'HHV-8 (Ensoli e Stürzl., 1998; Ensoli et al., in press). La formazione delle lesioni è mediata da citochine con effetti angiogenici, proliferativi edemigeni ed infiammatori prodotte da cellule KS, da cellule endoteliali attivate e da cellule immuni infiltranti i tessuti (Ensoli et al., 1989; Ensoli et al., 1994a; Ensoli et al., 1994b; Fiorelli et al., 1995; Samaniego et al., 1995; Samaniego et al., 1997; Samaniego et al., 1998; Barillari et al., 1999a). Tra i fattori angiogenici, il basic fibroblast growth factor (bFGF) è espresso ad alti livelli nelle lesioni ed è il fattore autocrino e paracrino più importante

per la crescita del KS e per l'angiogenesi (Ensoli et al., 1989; Ensoli et al., 1994a; Ensoli et al., 1994b; Samaniego et al., 1995; Fiorelli et al., 1995; Samaniego et al., 1997; Samaniego et al., 1998; Barillari et al., 1999a). Infatti, anticorpi o oligomeri antisenso diretti contro il bFGF bloccano sia l'angiogenesi che la formazione di lesioni simil-KS promosse dall'inoculazione di cellule KS primarie in topi nudi ma anche la crescita di cellule KS in vitro (Ensoli et al., 1989; Ensoli et al., 1994b; Barillari et al., 1999b). Viceversa, l'inoculazione di bFGF nei topi nudi promuove lo sviluppo di lesioni angioproliferative simil-KS (Ensoli et al., 1994a; Samaniego et al., 1998; Barillari et al., 1999a) la cui frequenza ed aggressività sono aumentate dalla proteina Tat di HIV-1, che è in grado di mimare l'azione di proteine della matrice extracellulare. In particolare, per agire sul KS, Tat richiede la presenza di bFGF o di citochine infiammatorie che inducono la produzione di bFGF che, a sua volta, promuove l'espressione dei recettori per il Tat (Ensoli et al., 1990; Barillari et al., 1992; Barillari et al., 1993; Ensoli et al., 1994a; Albini et al., 1995; Fiorelli et al., 1995; Fiorelli et al., 1998; Fiorelli et al., 1999; Barillari et al., 1999a e 1999b). Un altro induttore di crescita, di angiogenesi e di permeabilità vascolare presente nel KS è il Vascular endothelial growth factor (VEGF), che coopera con il bFGF all'angiogenesi e all'edema del KS (Samaniego et al., 1998). Altri fattori presenti nel KS e che cooperano alla sua formazione sono l'interleuchina (IL)-1, l'IL-6, il tumor necrosis factor (TNF) α , interferon (IFN) γ , il granulocyte-monocyte colony-stimulating factor (GM-CSF), il platelet-derived growth factor (PDGF), l'oncostatina-M e le β -chemochine (RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , ed altre)



(Ensoli e Stürzl., 1998; Ensoli et al., in press). In particolare, le citochine infiammatorie quali IL-1, IL-6, TNF α e IFN γ inducono cellule KS e cellule endoteliali a produrre bFGF e VEGF, inducono cellule endoteliali ad acquisire il fenotipo di cellule KS, sono angiogeniche in vivo ed inducono ad aumentarne lesioni KS nel topo (Samaniego et al., 1995; Fiorelli et al., 1995; Samaniego et al., 1997; Fiorelli et al., 1998; Barillari et al., 1999a).

Oltre a promuovere la crescita del KS, il bFGF, come il VEGF, è in grado di attivare tutti i processi che sono richiesti per indurre l'angiogenesi.

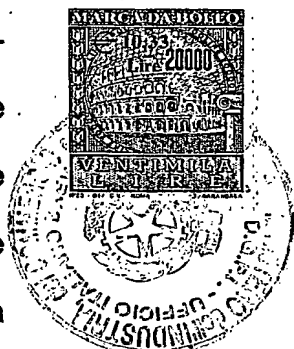
L'angiogenesi a sua volta è fondamentale per la crescita e metastasi dei tumori e per le malattie angioproliferative non neoplastiche ed è spesso una componente importante nelle malattie infiammatorie croniche (Carmeliet e Jain, 2000). L'angiogenesi richiede 3 distinti processi: la degradazione della membrana basale vascolare da parte delle proteasi endoteliali, la migrazione direzionale delle cellule nello spazio perivascolare

(invasione e migrazione delle cellule endoteliali) e la proliferazione delle cellule endoteliali (Carmeliet e Jain, 2000). In particolare, la degradazione

della membrana basale vascolare è mediata dalle metalloproteasi della matrice (MMP). Le stesse MMP sono necessarie alla crescita tumorale e metastatica e per l'infiltrazione di cellule infiammatorie nei tessuti (Stetler-

Stevenson, 1999). Tra queste, l'MMP-2 è essenziale per l'angiogenesi, è indotta da bFGF ed è fortemente espressa nelle lesioni primarie del KS ed in altre neoplasie (Ensoli et al., 1994a; Barillari et al., 1999b; Stetler-

Stevenson, 1999; Toschi et al., submitted). L'inibizione della migrazione, dell'invasione o della proliferazione delle cellule endoteliali, o dell'attività dell'MMP-2 è in grado di bloccare l'angiogenesi e costituisce il razionale



delle terapie anti-angiogeniche ed anti-tumorali attualmente in uso (Stetler-Stevenson, 1999; Koivunen et al., 1999; Carmeliet e Jain, 2000).

La minore incidenza e la regressione del KS osservati in individui infetti da HIV e trattati con HIV-PI (Lebbé et al., 1998; Cattelan et al., 1999; International Collaboration on HIV and Cancer, 2000) è stata messa in relazione con la capacità di questi farmaci di inibire la replicazione dell'HIV e, conseguentemente, la produzione ed il rilascio della proteina Tat dell'HIV-1, un potente fattore di progressione del KS (Ensoli et al., 1990; Ensoli et al., 1994a; Barillari et al., 1999a; Barillari et al., 1999b). Inoltre, ricostituendo il numero e la funzione di linfociti T citotossici specifici e l'attività natural killer, il trattamento con HIV-PI aumenta una risposta immune protettiva contro HHV-8 (Ensoli et al., in press), il virus considerato essere la causa del KS (Ensoli e Stürzl, 1998; Ensoli et al., in press). Infatti, in soggetti trattati con HIV-PI si osserva la riduzione della carica virale sia di HIV (Deeks et al., 1997), che di HHV-8 e la ricomparsa delle risposte immunologiche contro HHV-8 (Blum et al., 1997; Rizzieri et al., 1997; Lebbé et al., 1998; Osman et al., 1999; Sirianni et al., 1999; Sirianni et al., 2000; Wang et al., 2000).

Tuttavia, noi abbiamo ipotizzato che la minore incidenza e regressione del KS osservata in individui trattati con HIV-PI potesse essere dovuta ad un effetto anti-angiogenico, anti-tumorale, anti-edemigeno e/o anti-infiammatorio diretto di questi farmaci. Occorre rimarcare che questi effetti dei HIV-PI non erano anticipabili sulla base degli studi esistenti. Infatti, tutti gli studi concordano nell'attribuire la ridotta incidenza o la regressione del KS nei soggetti trattati con HIV-PI all'inibizione dell'infezione da

HIV con conseguente riduzione dell'espressione della proteina Tat, alla ricostruzione del sistema immune, o alla scomparsa dell'herpesvirus umano 8 dal sangue e dalle lesioni conseguente alla ricostituzione di risposte immuni umorali o cellulo-mediate efficaci contro il virus (Blum et al., 1997; Rizzieri et al., 1997; Lebbé et al., 1998; De Milito et al., 1999; Cattelan et al., 1999; Osman et al., 1999; Sirianni et al., 1999; Sirianni et al., 2000; Wang et al., 2000). Al contrario, gli effetti da noi ipotizzati dei HIV-PI non sono mai stati descritti o studiati in precedenza.

Sommario dell'invenzione

Costituisce oggetto della presente invenzione l'impiego degli inibitori della proteasi del virus HIV (HIV-PI) per realizzare farmaci ad azione anti-angiogenica per il trattamento dei tumori e delle malattie angioproliferative non neoplastiche in soggetti non infettati dal virus HIV.

Altro oggetto dell'invenzione è l'impiego degli inibitori della proteasi del virus HIV (HIV-PI) per realizzare farmaci ad attività anti-tumorale diretta in soggetti non infettati da HIV.

Altro oggetto dell'invenzione è l'impiego degli inibitori della proteasi del virus HIV (HIV-PI) per realizzare farmaci ad attività anti-edemigena, anti-infiammatoria e per la terapia delle malattie infiammatorie ed autoimmuni in soggetti non infettati da HIV.

Altro oggetto dell'invenzione è l'impiego degli inibitori della proteasi del virus HIV (HIV-PI) per realizzare farmaci per il trattamento del sarcoma di Kaposi in soggetti non infettati da HIV.

Altro oggetto dell'invenzione è l'impiego degli inibitori della proteasi del virus HIV (HIV-PI) per realizzare farmaci ad azione anti-angiogenica, anti-

tumorale, anti-edemigena e/o anti-infiammatoria, per il trattamento del sarcoma di Kaposi, dei tumori, e delle malattie angioproliferative non neoplastiche, infiammatorie ed autoimmuni in soggetti infettati con il virus HIV.

Ulteriore oggetto dell'invenzione è l'impiego per gli scopi suddetti dei composti denominati Crixivan® (indinavir) commercializzato da Merck Sharp e Dohme; Invirase® o Fortovase® (saquinavir), commercializzato da Roche; Norvir® (ritonavir), commercializzato da Abbott Laboratories; Viracept® (nelfinavir), commercializzato da Roche; Agenerase® (amprenavir), commercializzato da Glaxo Wellcome; Kaletra® (lopinavir e ritonavir), commercializzato da Abbott Laboratories.

Altro oggetto dell'invenzione è l'impiego degli inibitori della proteasi del virus HIV (HIV-PI) e dei composti sopra elencati per le indicazioni sopra riportate in combinazione tra loro e/o in associazione con farmaci anti-infiammatori, anti-angiogenici o anti-tumoral.

Ulteriore oggetto dell'invenzione è l'impiego di analoghi o derivati degli inibitori della proteasi di HIV, HIV-PI, e dei composti sopra elencati con attività anti-angiogenica, anti-tumorale, anti-edemigena ed anti-infiammatoria da soli o combinati tra loro e/o in associazione con farmaci anti-infiammatori, anti-angiogenici o anti-tumoral.

Ulteriori oggetti dell'invenzione risulteranno evidenti dalla seguente descrizione dettagliata dell'invenzione.

Breve descrizione delle Figure

Fig. 1 Indinavir e saquinavir inibiscono la formazione di lesioni angioproliferative indotte da bFGF nel topo nudo.



Fig. 2 Indinavir e saquinavir non interferiscono con la proliferazione di cellule endoteliali in risposta a bFGF.

Fig. 3 Indinavir e saquinavir inibiscono la migrazione delle cellule endoteliali in risposta a bFGF.

Fig. 4 Indinavir e saquinavir inibiscono l'invasione delle cellule endoteliali in risposta a bFGF.

Fig. 5 Indinavir blocca l'attivazione di MMP-2 in cellule endoteliali.

Fig. 6 Il saquinavir blocca l'attivazione di MMP-2 in cellule endoteliali.

Fig. 7 Indinavir e saquinavir promuovono la regressione di lesioni simil-KS indotta dall'inoculazione di cellule KS nel topo nudo.

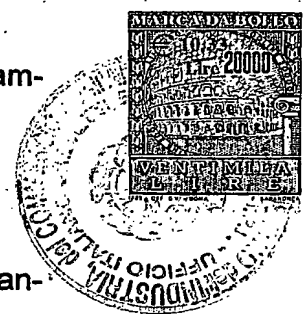
Fig. 8 Indinavir e saquinavir bloccano la permeabilità vascolare e l'edema promossi dall'inoculazione di cellule KS nel topo nudo.

Fig. 9 Indinavir e saquinavir inibiscono la capacità invasiva delle cellule KS.

Fig. 10 Indinavir e saquinavir bloccano la produzione di citochine infiammatorie quali l'IL-6 da parte di cellule KS.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

Il trattamento dei pazienti affetti da AIDS con combinazioni di farmaci antiretrovirali contenenti un inibitore della proteasi del virus HIV (HIV-PI) (per esempio indinavir o saquinavir) ha dimostrato di diminuire l'incidenza del KS e dei linfomi e di indurre la regressione del KS nei soggetti trattati (Lebbé et al., 1998; Cattelan et al., 1999; International Collaboration on HIV and Cancer, 2000). Questi effetti sono stati da altri attribuiti al blocco, da parte dei HIV-PI, della replicazione del virus HIV, al blocco della replicazione del virus HHV8, e/o alla ricostituzione di efficaci risposte im-





muni contro l'HHV8 e l'HIV (Blum et al., 1997; Rizzieri et al., 1997; Lebbé et al., 1998; De Milito et al., 1999; Cattelan et al., 1999; Osman et al., 1999; Sirianni et al., 1999; Sirianni et al., 2000; Wang et al., 2000). D'altra parte nostri studi passati e recenti indicano che citochine, fattori di crescita e angiogenici [particolarmente il basic fibroblast growth factor (bFGF)] prodotte da cellule di KS, endoteliali e cellule del sistema immunitario mediano la formazione delle lesioni di KS (Ensoli et al., 1989; Ensoli et al., 1994a; Fiorelli et al., 1995; Samaniego et al., 1995; Samaniego et al., 1997; Ensoli e Stürzl., 1998; Fiorelli et al., 1998; Samaniego et al., 1998; Barillari et al., 1999a; Fiorelli et al., 1999; Ensoli et al., in press). Pertanto, contrariamente all'opinione comune del mondo scientifico, abbiamo ipotizzato che nella combinazione di farmaci somministrati ai soggetti con AIDS e KS, l'effetto di regressione sul KS fosse dovuto ad un'attività diretta degli HIV-PI sull'angiogenesi, sulla crescita del tumore, sull'edema e sull'infiammazione. Tramite l'utilizzo di modelli in vivo ed in vitro abbiamo dimostrato che l'indinavir ed il saquinavir bloccano lo sviluppo di lesioni angioproliferative simil-KS indotte dall'inoculazione di bFGF o di cellule umane primarie di KS nei topi nudi. Questo effetto è dovuto al blocco della migrazione ed invasione di cellule endoteliali e tumorali ed è associato all'inibizione dell'attivazione di un enzima chiamato metalloproteasi-2 (MMP-2) da parte di indinavir o saquinavir usati alle stesse concentrazioni presenti nel plasma umano. Gli enzimi della classe delle metalloproteasi sono essenziali alla motilità cellulare (migrazione ed invasione) e, pertanto, all'angiogenesi ed alla crescita ed invasione dei tumori (Carmeliet e Jain, 2000). Inoltre, gli HIV-PI bloccano la permeabi-



lità vascolare e l'edema promosso dalle cellule KS nel topo nudo e la produzione di citochine da parte delle cellule KS. Queste citochine non solo contribuiscono alla promozione delle lesioni KS ma hanno anche attività infiammatoria (Ensoli et al., 1989; Barillari et al., 1992; Samaniego et al., 1995; Fiorelli et al., 1995; Samaniego et al., 1997; Sirianni et al., 1998; Samaniego et al., 1998; Fiorelli et al., 1998; Fiorelli et al., 1999; Barillari et al., 1999a) ed alcune di esse agiscono promovendo la crescita della malattia multicentrica di Castleman e di linfomi (Tosato et al., 1993; Peterson e Frizzera, 1993; Ramsay et al., 1994; Asou et al., 1998). Questi dati, quindi, indicano che l'effetto degli HIV-PI sul KS e sui linfomi è dovuto ad un blocco diretto sull'MMP-2, sulla migrazione ed invasione di cellule endoteliali e tumorali, sull'angiogenesi, sull'edema e sulla produzione di citochine determinando l'inibizione della formazione delle lesioni e la minore incidenza di tumori osservata nel modello murino e/o in soggetti trattati con HIV-PI.

E' importante sottolineare che questi effetti terapeutici sono stati ottenuti in assenza di HIV ed HHV8, escludendo, quindi, che gli effetti dei HIV-PI su KS, angiogenesi, permeabilità vascolare ed edema, infiammazione e produzione di citochine siano mediati da effetti degli HIV-PI su HIV e/o HHV-8.

La scoperta che gli inibitori della proteasi di HIV sono potenti farmaci anti-angiogenetici, anti-tumorali, anti-edemigeni ed anti-infiammatori e che bloccano l'attivazione di proteasi cellulari coinvolte in questi processi, apre un campo completamente nuovo e rappresenta, quindi, una nuova e differente indicazione terapeutica di questi farmaci ad un loro uso contro

l'angiogenesi, le patologie angioproliferative non neoplastiche, il KS, i tumori, e le malattie infiammatorie ed autoimmuni sia in soggetti infettati da HIV che nei soggetti non infettati da HIV.

Rientrano quindi nel campo della presente invenzione tutti quei composti che presentano attività come inibitori della proteasi del virus HIV (per brevità anche indicati come HIV-PI) ed analoghi o derivati degli stessi. A solo titolo esemplificativo si citano ad esempio quelli noti come indinavir, saquinavir, ritonavir, nelfinavir, amprenavir, lopinavir.

I composti HIV-PI sono impiegabili come segue sia in soggetti infettati da HIV che non:

- per la terapia del sarcoma di Kaposi (KS),
- per la terapia dell'angiogenesi
- per la terapia delle malattie angioproliferative non neoplastiche (occhio, rene, sistema vascolare, cute), quali ad es.: retinopatia diabetica, fibroplasia retrolentale, tracoma, glaucoma vascolare, psoriasi, infiammazione immune e non immune, aterosclerosi, cheloidi
- per la terapia dei tumori benigni e maligni dei tessuti molli, delle cartilagini, delle ossa e del sangue
- per bloccare l'attività del bFGF con effetto terapeutico anti-angiogenico, anti-tumorale, anti-KS
- per bloccare l'attività del VEGF con effetto terapeutico anti-angiogenico, anti-tumorale, anti-KS, anti-edemigeno
- per bloccare l'attività di bFGF e VEGF associati con effetto terapeutico anti-angiogenico, anti-tumorale, anti-KS, anti-edemigeno
- per bloccare l'attività di Tat da solo o in presenza di bFGF con effetto



terapeutico anti-angiogenico, anti-tumorale, anti-KS, anti-edemigeno ed anti-infiammatorio

- per bloccare la migrazione di cellule endoteliali con effetto terapeutico anti-angiogenico, anti-KS e anti-tumorale
- per bloccare la migrazione di cellule tumorali con effetto terapeutico anti-KS e anti-tumorale,
- per bloccare l'invasione di cellule endoteliali con effetto terapeutico anti-angiogenico, anti-KS e anti-tumorale
- per bloccare l'invasione di cellule tumorali con effetto terapeutico anti-KS e anti-tumorale
- per bloccare MMP-2 e altre proteasi coinvolte nell'angiogenesi (Carmeliet, Nature 2000),
- per bloccare MMP-2 ed altre proteasi coinvolte nella crescita e nelle metastasi dei tumori,
- per bloccare la permeabilità vascolare ed edema associati ad angiogenesi,
- per bloccare la permeabilità vascolare ed edema associati a tumori,
- per bloccare la permeabilità vascolare ed edema associati a KS,
- per bloccare la permeabilità vascolare ed edema associati ad infiammazione,
- per bloccare la produzione di citochine infiammatorie con effetto terapeutico anti-infiammatorio
- per bloccare la produzione di citochine, con effetto terapeutico anti-edemigeno
- per bloccare la produzione di citochine, con effetto terapeutico anti-



angiogenico

- per bloccare la produzione di citochine, con effetto terapeutico anti-KS
- per bloccare la produzione di citochine, con effetto terapeutico anti-tumorale
- per la terapia delle malattie autoimmuni in generale, in particolare lupus eritematoso sistemico, sclerodermia, artrite reumatoide, psoriasi, tiroiditi, rettocolite ulcerosa, morbo di Chron, sindrome di Goodpasture, vasculite sistemica, sindrome di Sjogen, cirrosi primitiva biliare
- per la terapia delle malattie infiammatorie, in particolare dell'infiammazione cronica associata ad allergie ed ad agenti infettivi virali, batterici o parassitari, inclusa la malattia multicentrica di Castleman.

Per gli usi sopra menzionati sono genericamente indicati tutti quei composti che manifestano attività inibitoria della proteasi del virus HIV, sono altresì particolarmente indicati i composti denominati: indinavir, saquinavir, ritonavir, nelfinavir, amprenavir, lopinavir e loro analoghi o derivati, da soli o in combinazione fra loro e/o in combinazione con altri farmaci.

Gli HIV-PI secondo l'invenzione possono essere somministrati per via orale, intravenosa, intramuscolare, subcutanea, intradermica, intraperitoneale, intratecale, intrapleurica, intrauterina, intravaginale, intrarettale topica, transmucosale, intralesionale o percutanea, per tutte le indicazioni sopra riportate. I dosaggi e le modalità di somministrazione sono in funzione del tipo di affezione da trattare. In particolare, si considerano dosaggi inferiori, uguali o superiori a quelli comunemente usati per il tratta-



mento dei pazienti con infezione da HIV. A titolo di esempio tali dosi sono per l'indinavir: 1200mg/die, 2400 mg/die e 4800 mg/die; e per il saquinavir: 1800 mg/die, 3600 mg/die 7200 mg/die.

Gli esempi di seguito riportati, che fanno riferimento anche alle figure e tabelle allegate, servono a verificare l'ipotesi da noi fatta. Sono stati utilizzati l'indinavir ed il saquinavir, due HIV-PI associati con la regressione del KS in pazienti trattati (Lebbé et al., 1998; Cattelan et al., 1999), di struttura simile ma con sostituenti chimici designati per ottimizzarne l'azione. Sono stati studiati gli effetti di ambedue gli HIV-PI in modelli di angiogenesi promossa da bFGF in vivo ed in vitro, sulla formazione di lesioni simil-KS e sulla permeabilità vascolare indotte in vivo dalle cellule KS e sulle cellule KS in vitro (Ensoli et al., 1989; Ensoli et al., 1994a e 1994b; Samaniego et al., 1995; Fiorelli et al., 1995; Samaniego et al., 1997; Samaniego et al., 1998; Barillari et al., 1999a; Sgadari et al., 2000).

La presente invenzione verrà pertanto descritta in relazione agli esempi seguenti, che sono da considerare illustrativi e non limitativi della portata della medesima, facendo riferimento alle figure e tabelle allegate.

Materiali e metodi/Descrizione dettagliata delle figure

Fig.1. L'indinavir e il saquinavir bloccano la formazione di lesioni angiogeniche simil-KS indotte da bFGF nei topi nudi.

(A) pannello a, topi iniettati sui due fianchi con tampone (PBS-0.1% BSA) in matrigel e trattati con soluzione salina; pannello b, topi iniettati sui due fianchi con bFGF (1 μ g) in matrigel e trattati con soluzione salina; pannello c, topi iniettati con bFGF (1 μ g) in matrigel e trattati con indinavir

(1.4 mg/die); pannello d, topi iniettati con bFGF (1 μ g) in matrigel e trattati con saquinavir (1 mg/die). (B) pannelli a, b, ingrandimenti 100X e 400X dei siti di inoculazione colorati con ematossilina/eosina dei topi iniettati con tampone e trattati con salina, rispettivamente; pannelli c e d, ingrandimenti 100X e 400X dei siti di inoculo dei topi iniettati con bFGF e trattati con salina, rispettivamente; pannelli e ed f, ingrandimenti 100X e 400X dei siti di inoculazione dei topi iniettati con bFGF e trattati con indinavir, rispettivamente; pannelli g e h, ingrandimenti 100X e 400X dei siti di inoculo dei topi iniettati con bFGF e trattati con saquinavir, rispettivamente. Gli esperimenti sono stati eseguiti (26) come descritto nella legenda della Tabella 1.

Fig. 2. Indinavir e saquinavir non hanno effetti sulla proliferazione basale o indotta da bFGF di cellule endoteliali primarie.

La figura mostra i risultati del saggio di proliferazione espressi come numero di cellule contate dopo 5 giorni di incubazione con bFGF (barre nere) o tampone (barre bianche) in presenza o assenza di 0.1, 1 o 10 μ M di indinavir o saquinavir. Cellule umane endoteliali da vena ombelicale (HUVEC, Bio-Whittaker, Verviers, Belgio) sono state piastrate in triplicato (1.5×10^4 cellule/pozzetto) in piastre da 12 pozzetti previamente coperti con gelatina. Il giorno seguente le cellule sono state incubate per 4 ore in terreno senza siero e coltivate in terreno RPMI 1640 (Life Technologies, Eragny, Francia) con aggiunta del 10% di siero fetale bovino (FBS) insieme con bFGF (10 ng/ml) o il suo tampone di diluizione (PBS). Il terreno, il bFGF, l'indinavir, il saquinavir o il tampone sono stati sostituiti dopo 3 giorni. Dopo 5 giorni di coltura, le cellule sono state contate dopo colo-

razione con tripan blu, come precedentemente descritto (Ensoli et al., 1990; Ensoli et al., 1994b). Per tutti gli studi in vitro l'indinavir o il saquinavir nella formulazione di polvere pura (Merck-Sharpe & Dhome e Roche, rispettivamente) sono stati risospesi in acqua distillata. I farmaci sono stati trovati privi di endotossine al saggio LAL (Associated of Cape Code Inc., Falmouth, MA).

Fig. 3 e 4. Indinavir e Saquinavir bloccano la migrazione e l'invasione di cellule endoteliali indotta da bFGF. La figura 3 mostra i risultati del saggio di migrazione e la figura 4 mostra i risultati del saggio di invasione delle cellule endoteliali espressi, rispettivamente, come il numero di cellule/campo che hanno migrato (Fig. 3) o invaso (Fig. 4) in risposta a bFGF (barre nere) o al suo tampone di diluizione (barre bianche) in presenza di 0.1, 1 o 10 μ M di indinavir o saquinavir o del tampone di diluizione.

Entrambi i saggi sono stati eseguiti mediante camera di Boyden separata in due compartimenti da filtri di policarbonato con pori del diametro di 12 μ m (Nucleoprobe, Cabin John, MD), coperti con collagene IV (Collaborative Biomedical Products) per il saggio di migrazione, o con collagene IV e Matrigel insieme per il saggio di invasione, come precedentemente descritto (Barillari et al., 1999b). Le HUVEC sono state coltivate per 5-6 giorni in presenza di concentrazioni scalari di indinavir o saquinavir, o il tampone di diluizione (controllo). Le cellule sono state raccolte, risospese in mezzo senza siero contenente 0.01% di BSA e messe nel compartimento superiore delle camere di Boyden in duplicato (2×10^5 cellule/camera) in presenza di indinavir, saquinavir o del tampone di diluizione. bFGF (50 ng/ml) è stato messo nel compartimento inferiore come



chemoattrattante in terreno contenente 0.01% BSA. Dopo 5 ore (migrazione) o 6 ore (invasione) di incubazione, le cellule non migrate presenti sulla superficie superiore dei filtri sono state rimosse meccanicamente, mentre le cellule migrate sulla superficie inferiore sono state fissate in metanolo e colorate con blu di toluidina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Le cellule presenti in 5-10 campi microscopici dei filtri, scelti in modo casuale, sono state contate come descritto in precedenza (Barillari et al., 1999b).

Fig. 5 e 6. Indinavir e saquinavir bloccano la conversione di MMP-2 latente nella sua forma attiva. La figura 5 si riferisce all'indinavir e la figura 6 al saquinavir.

(A) mostra un saggio di zimografia effettuato su supernatanti concentrati provenienti da HUVEC stimulate con bFGF (barre nere) o il suo tampone di risospensione (barre bianche), e coltivate per 24 ore in presenza di 0.1, 1 o 10 μ M di indinavir o saquinavir, rispettivamente. Le frecce indicano le aree decolorate dovute alla attività gelatinolitica corrispondente alle forme latenti (72 kD) o attive (64 kD e 62 kD) di MMP-2. (B) e (C) indicano la quantificazione densitometrica delle aree decolorate corrispondenti alla attività gelatinolitica delle forme latenti 72 kD o attive 64-62 kD di MMP-2 rilasciate dalle cellule. I risultati sono espressi come densità ottica delle bande decolorate.

Le HUVEC sono state coltivate per 24 ore in RPMI 1640 con aggiunta di 10% di FBS in presenza di concentrazioni scalari di indinavir, saquinavir o il tampone di diluizione, in assenza o presenza di bFGF (100 ng/ml). Le cellule sono state quindi lavate due volte con terreno senza siero e incu-

bate tutta la notte in terreno senza siero in presenza delle stesse concentrazioni di HIV-PI. I supernatanti delle colture cellulari sono stati poi raccolti e concentrati usando il Centricon-10 (Amicon, Bedford, MA). La concentrazione di proteina è stata determinata mediante l'analisi di Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA) usando come standard la BSA. Uguali quantità (5 µg) di proteina sono state poi diluite in tampone per zimografia (5X) (0.4 M Tris-HCl, pH 6.8, 5% SDS, 20% di glicerolo e 0.03% di bromofenolo blu) e caricate su gel di poliacrilamide al 9% di SDS contenenti 1 mg/ml di gelatina. Dopo l'elettroforesi, i gel sono stati incubati per 1 ora in 2.5% (v/v) di Triton X-100 per eliminare l'SDS e successivamente con tampone enzimatico (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.02% Brij-35) per tutta la notte a 37° C, come descritto in precedenza (Kleiner et al., 1993). I gel sono stati colorati con il 2.5% di blu di Comassie G-250 e decolorati in metanolo al 30% e acido acetico al 10%. La densitometria delle aree decolorate è stata quantificata usando un densitometro GS-700 connesso ad un computer Macintosh Performa con software Multi-Analyst (Bio-Rad).

Fig. 7 Indinavir e saquinavir bloccano la formazione delle lesioni KS indotte da cellule KS primarie nel topo nudo.

I topi nudi sono stati inoculati con cellule KS (3×10^6) per indurre la formazione di lesioni angioproliferative KS o con il suo tampone di risospensione (controllo) e trattati con indinavir, saquinavir o soluzione salina secondo le dosi e le modalità descritte nella legenda della figura 1. Al momento del sacrificio, i siti di inoculo sono stati esaminati per verificare la presenza di lesioni angioproliferative macroscopiche come descritto nella legen-



da della figura 1. Pannelli a, b, ingrandimenti 250X e 400X dei siti di inoculazione colorati con ematossilina ed eosina dei topi iniettati con cellule KS e trattati con salina, rispettivamente; pannelli c e d, ingrandimenti 250X e 400X dei siti di inoculo dei topi iniettati con cellule KS e trattati con indinavir, rispettivamente; pannelli e ed f, ingrandimenti 250X e 400X dei siti di inoculo dei topi iniettati con cellule KS e trattati con saquinavir, rispettivamente. Gli esperimenti sono stati eseguiti come descritto nella legenda della tabella 2.

Fig. 8 Indinavir e saquinavir bloccano la permeabilità vascolare ed edema indotti nel topo nudo dalle cellule KS.

Topi nudi sono stati trattati con indinavir, saquinavir o soluzione salina per 2 giorni con le stesse dosi e modalità già descritte. Al terzo giorno sono stati inoculati con pirilamina (80 µg in 100 µl di soluzione salina, 4 mg/kg, Sigma), per evitare l'interferenza del rilascio di istamina dovuto all'inoculo, subito dopo con 100 µl blu di Evan (5 mg/ml in soluzione salina) endovena e quindi per via sottocutanea con cellule KS (3×10^6 /topo) coltivate in vitro in presenza di indinavir, saquinavir (1 µM) o tampone di diluizione in 0.2 ml di Matrigel. Come controllo, ogni animale è stato inoculato controlateralmente con lo stesso volume del tampone di diluizione e Matrigel. Dopo 18 ore gli animali sono stati sacrificati e la quantità di colorante stravasato al sito di inoculo delle cellule KS misurata a livello dei due diametri perpendicolari maggiori mediante calibro. La quantità di colorante stravasato è stata anche valutata dopo prelievo della cute al sito di inoculo e quantificata allo spettrofotometro dopo estrazione con formamide per 24 ore a 56°C (Nakamura et al., 1992). La quantità di co-

lluv

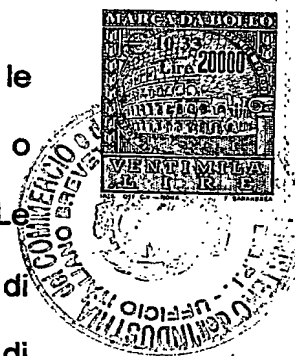
lorante stravasato è stata calcolata dopo sottrazione della densità ottica misurata al sito di controllo. Come mostrato in figura, il trattamento con indinavir o saquinavir ha ridotto la quantità di colorante stravasato del 39.8% ($p < 0.05$) e 44.5% ($p < 0.01$), rispettivamente, in caso di quantificazione allo spettrofotometro, e del 43.5% e 47.5%, rispettivamente, nel caso di misura tramite calibro.

Fig. 9 Indinavir e saquinavir inibiscono la capacità invasiva delle cellule KS.

La figura mostra il risultato di saggi di invasione effettuati su cellule KS coltivate in vitro per 5-6 giorni in presenza di indinavir o saquinavir o del tampone di diluizione (controllo). Entrambi i farmaci hanno inibito la capacità delle cellule KS di invadere la membrana di matrigel in maniera dose-dipendente. In particolare, ambedue i HIV-PI inibiscono l'invasione rispetto ai livelli osservati in cellule KS di controllo ($p < 0.05$).

Il saggio è stato eseguito come descritto nella figura 4. Brevemente, le cellule KS sono state coltivate per 5-6 giorni in presenza di indinavir o saquinavir (0.01 - 1 μ M) o del tampone di diluizione (soluzione salina). Le cellule sono state poi raccolte e piastrate in duplicato (5×10^5 in terreno di coltura contenente 0.05% BSA) nella parte superiore della camera di Boyden sempre in presenza di HIV-PI o tampone. Nella camera inferiore è stato posto bFGF (20 ng/ml) come chemoattrattante. Dopo 6 ore le cellule che hanno invaso la membrana di matrigel sono state colorate e contate come descritto nella legenda della figura 4.

Fig. 10 Indinavir e saquinavir inibiscono la produzione di citochine da parte di cellule di KS in vitro. La figura mostra le quantità di IL-6 presente



nel supernatante di cellule KS coltivate in assenza (controllo) o in presenza di indinavir (IND) o saquinavir (SAQ). Le cellule sono state piastrate in piastre da 6 pozzetti e coltivate per 5 giorni come descritto (Ensoli et al., 1990) in continua presenza o assenza di indinavir o saquinavir alle concentrazioni di 0.1, 1 e 10 μ M. Al quinto giorno, il terreno di coltura è stato sostituito con terreno privo di siero contenente albumina serica bovina (0.05% peso/volume) in presenza di indinavir o saquinavir alle concentrazioni indicate. Dopo 24 ore di incubazione, i supernatanti delle colture sono stati testati con saggio ELISA (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA) per determinare la quantità di IL-6 presente nel terreno. La quantità di IL-6 è espressa in picogrammi per ml di supernatante. Gli stessi tests sono stati eseguiti per il bFGF, VEGF, IL-1 α ed IL-1 β tramite ELISA commerciali. Sia l'indinavir che il saquinavir hanno ridotto la produzione di bFGF, VEGF, IL-1 α , IL-1 β ed IL-6.

Esempio 1

I topi nudi sono stati trattati con indinavir (1.4 mg/die), saquinavir (1 mg/die) o soluzione salina (controllo negativo) mediante gavage intragastrico una volta al giorno per 2 giorni (Kleiner et al., 1993). I topi sono stati quindi inoculati con bFGF (1 μ g) o con il suo tampone di diluizione in presenza di matrigel (Kleiner et al., 1993; Ensoli et al., 1994a; Samaniego et al., 1998; Barillari et al., 1999a). Il trattamento con indinavir, saquinavir o soluzione salina è stato effettuato ogni giorno per altri 5 giorni. I topi sono stati poi sacrificati e le zone di inoculazione esaminate sia macroscopicamente che microscopicamente per la presenza di lesioni angioproliferative simil-KS (Kleiner et al., 1993; Ensoli et al., 1994a; Sama-

niego et al., 1998; Barillari et al., 1999a). Concordamente a risultati precedenti (Ensoli et al., 1994a; Samaniego et al., 1998; Barillari et al., 1999a), l'inoculazione di 1 μ g di bFGF ha promosso lo sviluppo di lesioni angioproliferative nel 71% dei topi non trattati (Tabella 1). Al contrario, il trattamento con indinavir o saquinavir ha ridotto la percentuale di topi che hanno sviluppato lesioni al 28% o 25%, rispettivamente ($p < 0.05$) (Tabella 1). La figura 1A mostra un esempio di questi risultati. Il trattamento con indinavir o saquinavir ha bloccato completamente la formazione della lesione o ha ridotto di molto le dimensioni delle lesioni. L'esame microscopico dei siti di inoculazione nei topi trattati con indinavir o saquinavir ha mostrato una marcata riduzione dell'angiogenesi e della infiltrazione di cellule fusate in confronto a topi inoculati con bFGF non trattati con HIV-PI. In caso di totale regressione, il quadro istologico dei tessuti era simile o identico a quello osservato nei topi iniettati con il solo buffer (controllo negativo) (Fig. 1B).

Esempio 2

Per verificare quali dei processi richiesti per l'angiogenesi sia stato inibito dall'indinavir o dal saquinavir, sono stati eseguiti esperimenti di proliferazione, migrazione e invasione in risposta a bFGF su cellule endoteliali umane primarie coltivate in presenza o assenza di concentrazioni scalari di indinavir o di saquinavir che sono nello stesso ordine di grandezza di quelle presenti nel plasma di individui trattati (Deeks et al., 1997).

Come mostra la Fig. 2, gli HIV-PI non hanno avuto alcun effetto sulla proliferazione di cellule endoteliali basale o promossa dal bFGF a nessuna delle concentrazioni utilizzate (Fig. 2). Allo stesso modo, nessun ef-

fetto è stato notato con indinavir o saquinavir sulla sopravvivenza di cellule endoteliali. In contrasto, entrambi gli HIV-PI hanno inibito la migrazione (Fig. 3) e completamente bloccato l'invasione delle cellule endoteliali (Fig. 4) promossa da bFGF a tutte le concentrazioni studiate.

Esempio 3

La migrazione e l'invasione di cellule endoteliali sono mediate dall'azione proteolitica dell'MMP-2 attiva che degrada la membrana vascolare basale che permette alle cellule endoteliali di migrare, proliferare e formare nuovi vasi (Stetler-Stevenson, 1999). L'MMP-2 viene rilasciato dalle cellule endoteliali come proenzima (MMP-2 latente 72 kD) che viene attivato proteoliticamente sulla superficie della cellula nella forma 64/62 kD attraverso un meccanismo complesso che coinvolge altre proteasi (Stetler-Stevenson, 1999). Per verificare se l'indinavir o il saquinavir abbiano un effetto sull'attività dell'MMP-2 in cellule endoteliali sono stati eseguiti esperimenti per misurare l'attività gelatinolitica (Kleiner et al., 1993). L'indinavir o il saquinavir (Figura 5 e 6, rispettivamente) hanno effetti minimi o addirittura assenti sulla sintesi dell'MMP-2 latente, mentre entrambi bloccano la conversione dell'MMP-2 latente nella sua forma attiva (64/62 kD) in maniera dose-dipendente (Fig. 5 e 6). Questi effetti sono stati osservati dopo 24 ore di incubazione delle cellule con le stesse concentrazioni dei farmaci presenti nei plasma di pazienti trattati (Deeks et al., 1997). Effetti simili sono stati osservati anche dopo 5 giorni di incubazione nelle cellule in presenza dei HIV-PI.

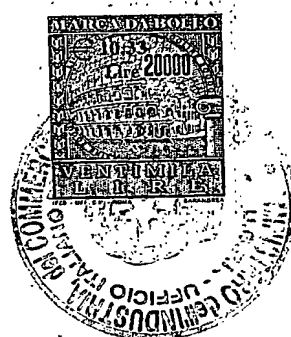
I risultati riportati indicano che indinavir e saquinavir hanno effetti anti-angiogenici diretti. L'inibizione dell'angiogenesi e della formazione di le-

sioni murine simil-KS indotte da bFGF da parte degli HIV-PI sono dovute al blocco della migrazione e dell'invasione delle cellule endoteliali. Questi processi, a loro volta, sono promossi dall'azione dell'MMP-2. L'indinavir o il saquinavir inibiscono la conversione dell'MMP-2 latente nella sua forma attiva con meccanismi ancora da determinare. Infatti, nessuna omologia è stata riscontrata tra la sequenza del sito attivo della proteasi dell'HIV e l'MMP-2 o altre MMP.

Anche se altre proteasi, coinvolte nell'angiogenesi, nella crescita ed invasione di tumori potrebbero essere bloccate dall'indinavir e dal saquinavir, l'MMP-2 rappresenta un esempio chiave di tale effetto. Inoltre, è stato dimostrato che l'MMP-2 è indotto dal bFGF o altri fattori inducenti l'angiogenesi (Ensoli et al., 1994a; Barillari et al., 1999b; Stetler-Stevenson, 1999), che sia bFGF che MMP-2 sono espressi nelle lesioni KS (Ensoli et al., 1989; Ensoli et al., 1994a; Samaniego et al., 1998; Toschi et al., submitted), e che l'inibizione di bFGF o di MMP-2 blocca l'angiogenesi e/o la formazione di lesioni di KS (Ensoli et al., 1989; Ensoli et al., 1994a; Ensoli et al., 1994b; Stetler-Stevenson, 1999; Koivunen et al., 1999; Carmeliet e Jain, 2000) e blocca la crescita dei tumori in generale (Koivunen et al., 1999; Carmeliet e Jain, 2000).

Esempio 4

Questi risultati sono stati confermati dall'effetto dell'indinavir o saquinavir sulla formazione di lesioni simil-KS promosse dall'inoculazione di cellule umane KS primarie in topi nudi, un modello in vivo ampiamente utilizzato in studi preclinici di efficacia di terapie anti-KS (Ensoli et al., 1994b; Koivunen et al., 1999; Sgadari et al, 2000). Queste lesioni angioproliferative





sono transienti, di origine murina, e si sviluppano in risposta a citochine, quali bFGF e VEGF, IL-1, IL-6, ed altre, rilasciate dalle cellule KS (Ensoli et al., 1989; Ensoli et al., 1994a; Ensoli et al., 1994b; Fiorelli et al., 1995; Samaniego et al., 1995; Samaniego et al., 1997; Sgadari et al., 2000). Gli animali sono stati trattati con le stesse modalità e dosi di indinavir o saquinavir utilizzate negli esperimenti illustrati precedentemente.

Come mostrato nella tabella 2, l'inoculazione di cellule KS ha indotto la formazione di lesioni simil-KS nel 100% degli animali. Il trattamento con indinavir o saquinavir ha ridotto la percentuale di topi che hanno sviluppato lesione al 50% e 17%, rispettivamente. All'analisi istologica, mentre le lesioni non trattate presentano un'intensa infiltrazione di cellule fusate, vasi neoformati, infiltrazione infiammatoria ed edema, le lesioni trattate mostrano una zona centrale di intensa necrosi con cellule dal nucleo picnotico, una marcata riduzione dell'infiltrazione di cellule fusate, della formazione di nuovi vasi e dell'infiltrazione infiammatoria specifica (Figura 7).

Esempio 5

Per dimostrare l'effetto dei HIV-PI sulla permeabilità vascolare e l'edema che è una componente clinica importante nel KS, nell'angiogenesi, nei tumori, e nelle malattie infiammatorie, sono stati eseguiti esperimenti di permeabilità vascolare su topi nudi inoculati con cellule KS che inducono edema poiché producono citochine con effetti edemigeni (VEGF, VEGF+bFGF, IL-1, IL-6, etc.). Topi nudi sono stati trattati con indinavir, saquinavir o soluzione salina per 2 giorni secondo le dosi e modalità già descritte nell'esempio 1, inoculati con blu di Evan endovena e quindi

iniettati con cellule KS coltivate in vitro in presenza di indinavir o saquinavir (1 μ M) o tampone di diluizione. Dopo 12 ore gli animali sono stati sacrificati, l'area colorata presente al sito di inoculo delle cellule KS misurata mediante calibro e la quantità di colorante stravasato quantificata spettrofotometricamente dopo estrazione con formamide (Nakamura, Science 1992). Come mostrato in figura 8, il trattamento con indinavir o saquinavir ha ridotto la quantità di colorante stravasato del 39.8 ($p < 0.05$) e del 44.5% ($p < 0.01$), rispettivamente, in caso di quantificazione allo spettrofotometro, e del 43.5% e 47.5%, rispettivamente, nel caso di misura tramite calibro (Figura 8).

Esempio 6

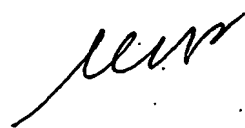
Per studiare i meccanismi degli effetti inibitori dei HIV-PI sulla formazione delle lesioni KS indotti da cellule KS, esperimenti di adesione, proliferazione, migrazione ed invasione sono stati effettuati coltivando le cellule KS in presenza di indinavir o saquinavir a concentrazioni comprese da 0.01 μ M a 1 μ M per 5-7 giorni. Come mostrato in tabella 3, l'indinavir o il saquinavir non inibiscono la capacità delle cellule KS di aderire ad un substrato di fibronectina. Ugualmente, il trattamento delle cellule KS con indinavir o saquinavir per 7 giorni non ha avuto effetto sulla proliferazione cellulare misurata mediante conta delle cellule vitali colorate con blu di tripan (tabella 3).

Per determinare se gli HIV-PI interferiscono con la capacità delle cellule KS di migrare e invadere la membrana basale in risposta a fattori angiogenici, cellule KS trattate per 5 giorni con indinavir o saquinavir (0.01 μ M - 1 μ M) sono state poste nel compartimento superiore di camere di

Boyden sempre in presenza degli HIV-PI, mentre bFGF è stato posto nel compartimento inferiore come chemoattattante. Come mostrato in tabella 3, né l'indinavir né il saquinavir hanno avuto effetti sulla migrazione delle cellule KS. In contrasto, entrambi i farmaci hanno inibito la capacità delle cellule KS di invadere in maniera dose-dipendente. In particolare, ambedue HIV-PI inibiscono l'invasione di cellule KS del 30-40% ($p < 0.05$) (Tabella 3 e Figura 9).

Esempio 7

Le cellule KS secernono citochine ad attività infiammatoria, edemigena, angiogenica e proliferativa con effetti autocrini e paracrini (Ensoli e Stürzl., 1998; Ensoli et al., in press). Questi fattori mediano la formazione delle lesioni simil-KS nelle sue varie componenti (angiogenesi, proliferazione cellulare, infiltrazione infiammatoria, edema) e la permeabilità vascolare e l'edema indotti dalle cellule KS nei topi nudi. Per determinare gli effetti di indinavir e saquinavir sulla produzione di citochine, cellule KS sono state coltivate in presenza o assenza di concentrazioni scalari di indinavir o saquinavir. La quantità di bFGF, VEGF, IL-1 e IL-6 è stata dosata con saggi immuno-enzimatici nei supernatanti delle cellule KS dopo 24 ore di coltura in assenza di siero ed in continua presenza dei due HIV-PI (ELISA). Indinavir e saquinavir hanno inibito la produzione di bFGF, VEGF, IL-1 α , IL-1 β ed IL-6 da parte di cellule KS. Come esempio di questi effetti, in figura 10 è mostrata l'inibizione di IL-6 una tipica citochine infiammatoria prodotta da cellule KS ed endoteliali ma anche da linfociti e monociti del sangue e dei tessuti e che ha anche effetti angiogenici (Mateo et al., 1994; Cohen et al., 1996). Inoltre IL-6 svolge un ruolo chiave



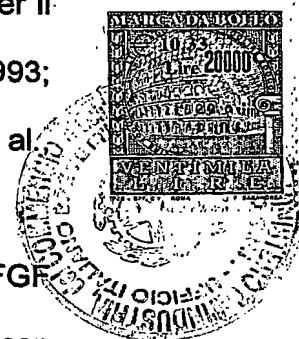
nella malattia multicentrica di Castleman e nella crescita dei linfomi (Tosato et al., 1993; Peterson e Frizzera, 1993; Asou et al., 1998; Ramsay et al., 1994), un altro tipo di tumore la cui incidenza è ridotta in pazienti trattati con gli HIV-PI (International Collaboration on HIV and Cancer, 2000).

Esempio 8

Il Tat di HIV aumenta la frequenza e l'aggressività del KS in soggetti infettati da HIV-1 (Ensoli et al., 1994a). Ciò è dovuto all'induzione da parte di Tat dell'adesione, migrazione, invasione e proliferazione delle cellule endoteliali e di KS. Infatti Tat aumenta in maniera sinergistica gli effetti del bFGF sull'angiogenesi e sul KS (Ensoli et al., 1994a; Barillari et al., 1999a e 1999b). Tat però richiede la presenza del bFGF o delle citochine infiammatorie che inducono la produzione di bFGF per esercitare la sua azione sul KS, in quanto bFGF aumenta l'espressione dei recettori per il Tat sulle cellule e sui tessuti (Barillari et al., 1992; Barillari et al., 1993; Albini et al., 1995; Fiorelli et al., 1995; Fiorelli et al., 1999; Barillari et al., 1999a; Barillari et al., 1999b).

Pertanto, per verificare se gli HIV-PI inibiscono l'effetto di Tat e bFGF combinanti sull'angiogenesi e sul KS, topi nudi sono stati inoculati con bFGF e Tat e trattati con indinavir, saquinavir o con il buffer usato per risospenderli. Come mostrato in tabella 4, sia l'indinavir che il saquinavir hanno ridotto la percentuale di topi nudi che hanno sviluppato lesioni KS (50% e 20%, rispettivamente).

Questi risultati indicano che gli HIV-PI hanno effetti inibitori specifici sull'angiogenesi e, di conseguenza, sulla crescita dei tumori, i quali ne-



cessitano dell'angiogenesi per crescere e metastatizzare. Gli HIV-PI hanno anche diretti effetti inibitori sull'invasione delle cellule KS, sulla crescita di lesioni KS, sulla permeabilità vascolare e sull'edema indotti nel topo dalle cellule KS. Inoltre, gli HIV-PI inibiscono la produzione di citochine ed altri fattori che mediano la formazione del KS e la crescita di altri tumori e l'infiltrazione infiammatoria ad essi associata. Gli HIV-PI hanno infatti anche effetti anti-infiammatori in quanto riducono la produzione di citochine quali IL-6, IL-1, e probabilmente altre citochine coinvolte nell'infiammazione e che sono anche presenti nelle lesioni di KS umane o di topo. Queste stesse citochine, infiammatorie sono in grado di indurre la produzione di fattori angiogenici (bFGF, VEGF) ed hanno anche effetti angiogenici in vivo (Barillari et al., 1992; Samaniego et al., 1995; Fiorelli et al., 1995; Samaniego et al., 1997; Samaniego et al., 1998; Fiorelli et al., 1998; Fiorelli et al., 1999; Barillari et al., 1999a). In particolare l'IL-6, gioca anche un ruolo chiave nella malattia multicentrica di Castleman e nella crescita di linfomi (Tosato et al., 1993; Peterson e Frizzera, 1993; Ramsay et al., 1994; Asou et al., 1998).

Gli HIV-PI legano il sito attivo della proteasi di HIV, che appartiene alla famiglia delle aspartil-proteasi. E' stato recentemente dimostrato che questi farmaci possono inibire una aspartil-proteasi fungina (Cassone et al., 1999). Tuttavia, nessuna delle proteasi conosciute che sono coinvolte nell'angiogenesi, nella crescita e nella metastasi tumorale, nella permeabilità vascolare o nella infiammazione è una aspartil proteasi, né sono state evidenziate tramite indagine di omologia di sequenza similitudini tra il sito attivo della proteasi di HIV e le proteasi coinvolte in questi processi.



Pertanto, gli effetti da noi dimostrati sull'MMP, sulla motilità cellulare, sull'angiogenesi, sul KS, sulla permeabilità vascolare e sulla produzione di citochine erano del tutto imprevedibili e non anticipabili.

Infatti, benché alcuni studi abbiano suggerito che gli HIV-PI abbiano un effetto sul metabolismo cellulare (Deeks et al., 1997; André et al., 1998; Weichold et al., 1999; Ledru et al., 2000; Tovo, 2000), tuttavia, abbiamo dimostrato che gli HIV-PI esercitano un'attività anti-angiogenica, anti-tumorale, anti-edemigena ed anti-infiammatoria diretta che non è collegata con aspartil-proteasi conosciute né con gli effetti degli HIV-PI sulla replicazione dell'HIV o dell'HHV-8. Infatti, i modelli in vitro ed in vivo di angiogenesi e di KS impiegati in questo studio sono privi di qualsiasi agente infettivo.

Gli stessi risultati sono stati ottenuti sia con indinavir che saquinavir, che condividono con gli altri HIV-PI una struttura simile pur con sostituenti chimici specifici di ciascun farmaco. Per cui questi dati indicano che le attività degli HIV-PI da noi scoperte per indinavir e saquinavir sono una proprietà comune a tutti gli HIV-PI e concorda con gli effetti dei differenti HIV-PI osservati negli individui trattati (Lebbé et al., 1998; Cattelan et al., 1999; International Collaboration on HIV and Cancer, 2000).

I suddetti effetti degli HIV-PI vengono osservati alle stesse concentrazioni di farmaco presenti nel plasma di pazienti trattati e che sono tollerate abbastanza bene da questi individui. Similmente, non sono stati osservati effetti tossici dell'indinavir o del saquinavir nei topi trattati. Inoltre, l'indinavir e saquinavir non hanno mostrato effetti sulla sopravvivenza o sulla crescita di cellule endoteliali, ma hanno selettivamente mostrato

effetti sulla loro migrazione ed invasione, suggerendo che gli HIV-PI non danneggiano vasi pre-esistenti. Dal momento che la motilità della cellula e l'angiogenesi sono essenziali non solo per lo sviluppo del KS, ma anche per la crescita e metastasi di tumori (Carmeliet e Jain, 2000; Stetler-Stevenson, 1999), i risultati descritti fin qui indicano che i HIV-PI costituiscono promettenti farmaci anti-angiogenici e anti-tumoral. Inoltre gli stessi risultati indicano che gli HIV-PI bloccano la permeabilità vascolare e l'infiammazione indotte da citochine infiammatorie e fattori di permeabilità vascolare, e la produzione di citochine con ruolo chiave nella malattia multicentrica di Castleman e nella crescita dei linfomi (Tosato et al., 1993; Peterson e Frizzera, 1993; Ramsay et al., 1994; Asou et al., 1998). Gli HIV-PI e loro analoghi o derivati potrebbero, perciò, essere sfruttati per bloccare l'angiogenesi, la crescita, invasione e metastasi di tumori solidi e del sangue, l'edema e l'infiammazione e, quindi, essere impiegati con successo nella terapia del KS, dei tumori, delle patologie angioproliferative, e delle malattie infiammatorie ed autoimmuni sia in soggetti HIV sieronegativi che in soggetti infettati da HIV.

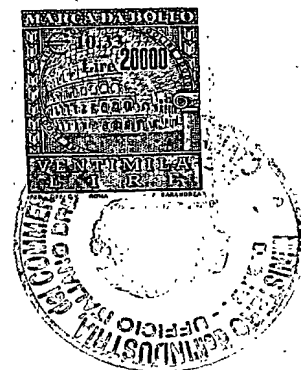
Tabella 1. Indinavir e saquinavir bloccano l'angiogenesi e la formazione di lesioni KS indotte da bFGF in topi nudi

Trattamento	Iniezione	N. di topi con lesioni vascolari macroscopiche/ N. di topi inoculati	%
Soluzione salina	Tampone	0/18	0
Soluzione salina	bFGF	20/28	71
Indinavir	bFGF	8/28	28
Saquinavir	bFGF	7/28	25



I topi nudi sono stati inoculati con bFGF (1 μ g) per indurre la formazione di lesioni angioproliferative simil-KS o con il suo tampone di risospensione (controllo) e trattati con indinavir, saquinavir o soluzione salina. Al momento del sacrificio, i siti di inoculo sono stati esaminati per verificare la presenza di lesioni angioproliferative macroscopiche. Sono qui riportati il numero (N.) di topi che hanno sviluppato lesioni rispetto al numero (N.) di topi inoculati, e la percentuale (%) di topi che hanno sviluppato lesioni. La riduzione del numero di lesioni simil-KS agli animali trattati è statisticamente significativa (test standard per le proporzioni, $p < 0.05$).

Le stesse formulazioni di indinavir (Merck-Sharp and Dhome Ltd., Haarlem, NL) o saquinavir (Roche, Hertfordshire, GB) utilizzate nei pazienti infetti da HIV sono state disciolte in soluzione salina e somministrate a topi nudi (Balb/c nu/nu femmine, Charles River, Calco, Italia, 5-6 settimane di età) tramite gavage intragastrico. Per testarne la tossicità, indinavir e saquinavir sono stati somministrati una volta al giorno per un totale di 8 giorni alle dosi di 35, 70 o 17.5 mg/Kg/giorno o di 18, 36 o 9 mg/Kg/die, rispettivamente, in un volume di 0.4 ml. Queste dosi corrispondono, rispettivamente, alla dose intera, al doppio o alla metà della dose di HIV-PI utilizzata giornalmente nei pazienti infetti da HIV (Deeks et al., 1997). Per nessuna di queste dosi è stata osservata tossicità d'organo o sistemica. I topi sono stati trattati con 70mg/Kg/die di indinavir (corrispondenti a 1.4 mg/die) o con 36 mg/KG/die di saquinavir (corrispondenti a 1 mg/die) una volta al giorno per un totale di 7 giorni, a partire da due giorni prima dell'inoculazione di bFGF. Gli animali di controllo sono stati trattati con lo stesso volume di soluzione salina. Il terzo giorno i topi sono stati inoculati



sottocute a livello del quadrante dorsale inferiore con 1 μ g di bFGF ricombinante (Roche Mannheim, Germania) diluiti in 0.2 ml di tampone fosfato (PBS)-0.1% albumina sierica bovina (BSA) o con il suo tampone di risospensione, mischiati con 0.2 ml di Matrigel (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA) prima dell'inoculazione, come descritto in precedenza (Ensoli et al., 1994a). Quattro giorni dopo i topi sono stati sacrificati, le zone di inoculo esaminate per verificare la presenza di lesioni angioproliferative simil-KS macroscopiche, e sezioni di tessuto esaminate istologicamente dopo colorazione con ematossilina-eosina.

Tabella 2. Indinavir e saquinavir bloccano la formazione di lesioni KS angioproliferative promosse da inoculazione di cellule KS primarie in topi nudi.

Inoculo	Terapia	N. di topi con lesioni vascolari macroscopiche/N. topi iniettati (%)
Cellule KS	Salina	4/4 (100)
	Indinavir	3/6 (50)
	Saquinavir	1/6 (16.7)

I topi nudi sono stati inoculati con cellule KS (3×10^6) per indurre la formazione di lesioni angioproliferative simil-KS o con il suo tampone di risospensione (controllo) e trattati con indinavir, saquinavir o soluzione salina secondo le dosi e le modalità descritte nella legenda della tabella 1. Al momento del sacrificio, i siti di inoculo sono stati esaminati per verificare la presenza di lesioni angioproliferative macroscopiche come descritto nella legenda della figura 1. Sono qui riportati il numero (N.) di topi che hanno sviluppato lesioni rispetto al numero (N.) di topi inoculati, e la percentuale (%) di topi che hanno sviluppato lesioni. Il quadro istologico dei siti di inoculo è mostrato nella figura 7.

Tabella 3. Effetti di indinavir o saquinavir sulle cellule KS in vitro.

Cellule KS	Indinavir (μM)*			Saquinavir (μM)*		
	0.01	0.1	1	0.01	0.1	1
Adesione	ND	ND	1.05	ND	ND	1
Proliferazione	1	1.08	1.11	1	1.15	1.25
Migrazione	ND	ND	1.03	ND	ND	1.21
Invasione	0.98	0.74**	0.71**	1	0.79**	0.62**

*Aumento espresso in fold verso il controllo (1 fold)

**p < 0.05

ND, non determinato

Gli esperimenti di adesione, proliferazione, migrazione ed invasione sono stati effettuati coltivando le cellule KS in presenza di indinavir o saquinavir a concentrazioni comprese tra 0.01 e 1 μM per 5-7 giorni. L'indinavir o il saquinavir non inibiscono la capacità delle cellule KS di aderire ad un substrato di fibronectina. Ugualmente, il trattamento delle cellule KS con indinavir o saquinavir per 7 giorni non ha avuto effetto sulla proliferazione cellulare misurata mediante conta delle cellule vitali colorate con blu di tripan.

Né l'indinavir né il saquinavir hanno avuto effetti sulla migrazione delle cellule KS. In contrasto, entrambi i farmaci hanno inibito la capacità delle cellule KS di invadere la membrana di matrigel in maniera dose-dipendente (p < 0.05).

Per gli esperimenti di migrazione ed invasione cellule KS trattate per 5 giorni con indinavir o saquinavir (0.01 μM - 1 μM) sono state poste nel compartimento superiore di camere di Boyden sempre in presenza dei HIV-PI, mentre bFGF è stato posto nel compartimento inferiore come

chemoattattante.

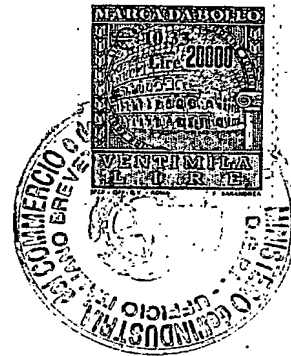
Tabella 4. Indinavir e saquinavir bloccano la formazione di lesioni KS angioproliferative promosse dall'inoculazione di bFGF e HIV-Tat associati nel topo nudo

Inoculo	Terapia	N. di lesioni vascolari macroscopiche/N. topi iniettati (%)
Tampone	Soluzione salina	0/18 (0%)
bFGF + Tat	Soluzione salina	7/10 (70%)
bFGF + Tat	Indinavir	5/10 (50%)
bFGF + Tat	Saquinavir	2/10 (20%)

I topi nudi sono stati inoculati con bFGF (1 μ g) e Tat (10 μ g) in associazione per indurre la formazione di lesioni angioproliferative simil-KS o con il suo tampone di risospensione (controllo) e trattati con indinavir, saquinavir o soluzione salina. Al momento del sacrificio, i siti di inoculo sono stati esaminati per verificare la presenza di lesioni angioproliferative macroscopiche. Sono qui riportati il numero (N.) di topi che hanno sviluppato lesioni rispetto al numero (N.) di topi inoculati, e la percentuale (%) di topi che hanno sviluppato lesioni. I topi sono stati trattati con indinavir o saquinavir secondo le modalità e dosi descritte nella tabella 1 per un totale di 7 giorni, a partire da due giorni prima dell'inoculazione di bFGF e Tat. Gli animali di controllo sono stati trattati con lo stesso volume di soluzione salina. Il terzo giorno i topi sono stati inoculati sottocute a livello del quadrante dorsale inferiore con 1 μ g di bFGF ricombinante (Roche Mannheim, Germania) e 10 μ g di HIV-1 Tat diluiti in 0.2 ml di PBS-0.1% BSA o con il suo tampone di risospensione, mischiati con 0.2 ml di Matrigel prima dell'inoculazione, come descritto in precedenza (8). Quattro

luvo

giorni dopo i topi sono stati sacrificati, le zone di inoculo esaminate per verificare la presenza di lesioni angioproliferative simil-KS macroscopiche, e sezioni di tessuto esaminate istologicamente dopo colorazione con ematossilina-eosina.





REFERENZE

- Albini A., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 4838 (1995).
- André P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 13120 (1998).
- Asou H. et al., Blood 91, 2475 (1998).
- Barillari G. et al., J. Immunol. 149, 3727 (1992).
- Barillari G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7941 (1993).
- Barillari G. et al., J. Immunol. 162, 1165- (1999a).
- Barillari G. et al., Blood 94, 663 (1999b)
- Blum L. et al., AIDS 11, 1653 (1997).
- Carmeliet P., R. K. Jain, Nature 404, 249 (2000).
- Cassone A. et al., J. Infect. Dis. 180, 448 (1999).
- Cattelan A. M. et al., Eur. J. Cancer 35, 1809 (1999).
- Cohen T. et al., J. Biol. Chem. 271, 736 (1996).
- De Milito A. et al., J. Med. Virol. 57, 140 (1999).
- Deeks S. G. et al., JAMA 277, 145 (1997).
- Ensoli B. et al., Science 243, 223 (1989).
- Ensoli B. et al., Nature 345, 84 (1990).
- Ensoli B. et al., Nature 371, 674 (1994a).
- Ensoli B. et al., J. Clin. Invest. 94, 1736 (1994b).
- Ensoli B., M. Stürzl, Cytokine Growth Factor Rev. 9, 63 (1998).
- Ensoli B., et al., Adv. Cancer Res., in press.
- Fiorelli V. et al., J. Clin. Invest. 95, 1723 (1995).
- Fiorelli V., et al. Blood 91, 956 (1998).
- Fiorelli V., et al. J. Immunol. 162, 1165 (1999).
- International Collaboration on HIV and cancer, J. Natl. Cancer Inst. 92,



1823 (2000).

Kleiner D. E., W. G. Stetler-Stevenson, Anal. Biochem. 218, 325 (1993).

Koivunen E., et al., Nat. Biotechnol. 17, 768 (1999).

Lebbè C. et al., AIDS 12, 45 (1998).

Ledru E. et al., Blood 95, 3191 (2000).

Masood R. Z. Y. et al., Blood 85, 3423 (1995).

Mateo R. B. et al., Am. J. Physiol. 266, R1840 (1994).

Meade-Tollin L. C. et al., Acta Histochem. 101, 305 (1999).

Nakamura S. et al. Science 255, 1437 (1992).

Osman M., et al. J. Virol. 73, 6136 (1999).

Peterson B. A., G. Frizzera, Semin. Oncol. 20, 636 (1993).

Ramsay A. J. et al., Science 264, 561 (1994).

Rizzieri D. A. et al., Lancet 349, 775 (1997).

Samaniego F. et al., J. Immunol. 154, 3582 (1995).

Samaniego F. et al., J. Immunol. 158, 1887 (1997).

Samaniego F. et al., Am. J. Pathol. 152, 1433 (1998).

Sgadari C. et al., J. Immunol. 165, 509 (2000).

Sirianni M. C. et al. Blood 91, 968 (1998).

Sirianni M. C. et al. 2nd international workshop on KSHV/HHV8 and related agents. St. Catherine's College, Oxford, UK. 10-13 September (1999).

Sirianni M. C. et al. 3rd International workshop on Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and related agents. Amherst, MA, USA. June 6-10 (2000).

Stetler-Stevenson W. G., J. Clin. Invest. 103, 1237 (1999).



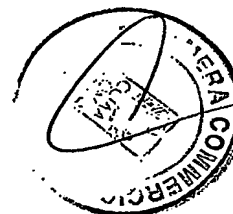
Tosato G. et al. J. Clin. Invest. 91, 2806 (1993).

Toschi E. et al., submitted.

Tovo P. A., AIDS 14, 743 (2000).

Wang Q. J. et al., J. Infect. Dis. 182, 928 (2000).

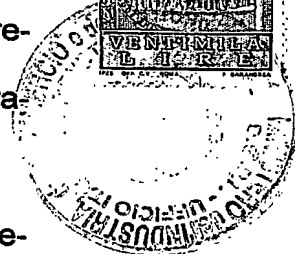
Weichold F. F. et al., J. Hum. Virol. 2, 261 (1999).



RIVENDICAZIONI

RM2001 A 000210

1. Impiego degli inibitori della proteasi del virus HIV, HIV-PI, per la preparazione di farmaci per la terapia dell'angiogenesi.
2. Impiego degli inibitori delle proteasi del virus HIV, HIV-PI, per la preparazione di farmaci per la terapia delle malattie angioproliferative non neoplastiche.
3. Impiego secondo la riv. 2 in cui le malattie angioproliferative non neoplastiche sono scelte tra: retinopatia diabetica, fibroplasia retrolentale, tracoma, glaucoma vascolare, psoriasi, infiammazione immune e non immune, aterosclerosi, cheloidi.
4. Impiego degli inibitori della proteasi del virus HIV, HIV-PI, per la preparazione di farmaci per la terapia dei tumori.
5. Impiego secondo la riv. 4 in cui il tumore è scelto fra: tumori benigni e maligni dei tessuti molli, delle cartilagini, delle ossa e del sangue.
6. Impiego degli inibitori della proteasi del virus HIV, HIV-PI, per la preparazione di farmaci per la terapia del sarcoma di Kaposi (KS).
7. Impiego degli inibitori della proteasi del virus HIV, HIV-PI, per la preparazione di farmaci per bloccare l'attività del bFGF, con effetto terapeutico anti-angiogenico, anti-KS e anti-tumorale.
8. Impiego degli inibitori della proteasi del virus HIV, HIV-PI, per la preparazione di farmaci per bloccare l'attività del VEGF, con effetto terapeutico anti-angiogenico, anti-KS, anti-tumorale ed anti-edemigeno.
9. Impiego degli inibitori della proteasi del virus HIV, HIV-PI, per la preparazione di farmaci per bloccare l'attività di bFGF e VEGF associati, con effetto terapeutico anti-angiogenico, anti-KS, anti-tumorale ed an-



ti-edemigeno.

10. Impiego degli inibitori della proteasi del virus HIV, HIV-PI, per la preparazione di farmaci per bloccare l'attività di Tat da solo o associato a bFGF, con effetto terapeutico anti-angiogenico, anti-KS, anti-tumorale, anti-edemigeno ed anti-infiammatorio in soggetti con infezione da HIV.
11. Impiego degli inibitori della proteasi del virus HIV, HIV-PI, per la preparazione di farmaci per bloccare la migrazione di cellule endoteliali, con effetto terapeutico anti-angiogenico, anti-KS ed anti-tumorale.
12. Impiego degli inibitori della proteasi del virus HIV, HIV-PI, per la preparazione di farmaci per bloccare la migrazione di cellule tumorali, con effetto terapeutico anti-KS ed anti-tumorale.
13. Impiego degli inibitori della proteasi del virus HIV, HIV-PI, per la preparazione di farmaci per bloccare l'invasione di cellule endoteliali, con effetto terapeutico anti-angiogenico, anti-KS ed anti-tumorale.
14. Impiego degli inibitori della proteasi del virus HIV, HIV-PI, per la preparazione di farmaci per bloccare l'invasione di cellule tumorali, con effetto terapeutico anti-KS ed anti-tumorale.
15. Impiego degli inibitori della proteasi del virus HIV, HIV-PI, per la preparazione di farmaci per bloccare MMP-2 e le altre proteasi coinvolte nell'angiogenesi.
16. Impiego degli inibitori della proteasi del virus HIV, HIV-PI, per la preparazione di farmaci per bloccare le proteasi coinvolte nella crescita e metastasi dei tumori.
17. Impiego degli inibitori della proteasi del virus HIV, HIV-PI, per la pre-

parazione di farmaci per bloccare la permeabilità vascolare ed edema associati ad angiogenesi.

18. Impiego degli inibitori della proteasi del virus HIV, HIV-PI, per la preparazione di farmaci per bloccare la permeabilità vascolare ed edema associati ad infiammazione.
19. Impiego degli inibitori della proteasi del virus HIV, HIV-PI, per la preparazione di farmaci per bloccare la permeabilità vascolare ed edema associati a tumori.
20. Impiego degli inibitori della proteasi del virus HIV, HIV-PI, per la preparazione di farmaci per bloccare la permeabilità vascolare ed edema associati a KS.
21. Impiego degli inibitori della proteasi del virus HIV, HIV-PI, per la preparazione di farmaci per la terapia delle malattie autoimmuni.
22. Impiego secondo la riv. 21 in cui la malattia autoimmune è scelta fra: artrite reumatoide, lupus eritematoso sistemico, tiroiditi, sindrome di Goodpasture, vasculite sistemica, sclerodermia, sindrome di Sjogren, cirrosi primitiva biliare, rettocolite ulcerosa e morbo di Chron, psoriasi.
23. Impiego degli inibitori della proteasi del virus HIV, HIV-PI, per la preparazione di farmaci per la terapia delle malattie infiammatorie.
24. Impiego secondo la riv. 23 in cui la malattia infiammatoria è scelta fra: allergie ed infiammazioni croniche associate ad agenti infettivi virali, batterici o parassitari, incluso la malattia multicentrica di Castleman.
25. Impiego degli inibitori delle proteasi del virus HIV, HIV-PI, per la preparazione di farmaci per il blocco della produzione di citochine in-

fiammatorie, con effetto terapeutico anti-infiammatorio, anti-edemigeno, anti-angiogenico, anti-KS ed anti-tumorale.

26. Impiego secondo le rivendicazioni 1-25 in cui l'inibitore della proteasi del virus HIV, HIV-PI, è scelto fra: indinavir, saquinavir, ritonavir, nel-finavir, amprenavir, lopinavir, analoghi o derivati con gli stessi effetti, da soli o in combinazione fra loro, e/o in associazione con farmaci anti-infiammatori, anti-angiogenici od anti-tumoralì .
27. Impiego secondo le rivendicazioni 1-26 in soggetti infettati da HIV.
28. Impiego secondo le rivendicazioni 1-27 da somministrare secondo una modalità scelta fra la via orale, intravenosa, intramuscolare, sub-cutanea, intradermica, intraperitoneale, intratecale, intrapleurica, intrauterina, transmucosale, rettale, vaginale, intralesionale o percutanea.
29. Impiego secondo le rivendicazioni 1-28 in cui il dosaggio è scelto fra i seguenti: per l'indinavir: 1200mg/die, 2400 mg/die e 4800 mg/die; e per il saquinavir: 1800 mg/die, 3600 mg/die 7200 mg/die.

/PV

Roma, 18 Aprile 2001

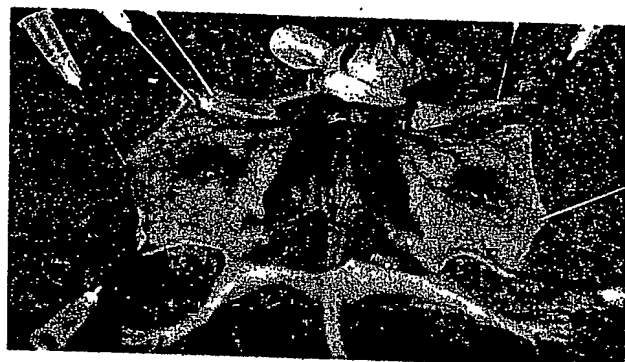
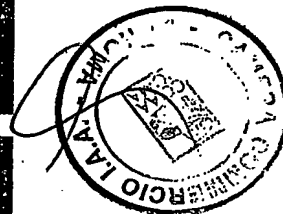
Per Istituto Superiore di Sanità

Il Mandatario


Dott.ssa Maria Vittoria Primiceri



RM2001 A 000210

A**a****b****c****d****Figura 1A**

2770PTIT

Tavola 2 di 11

B

RM2001 A 000210

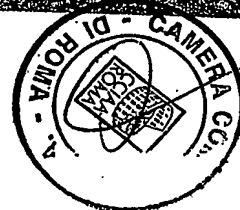
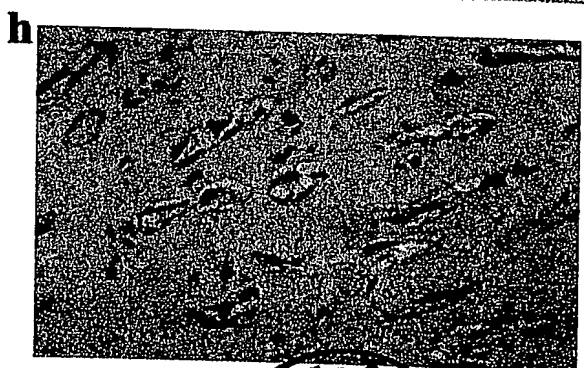
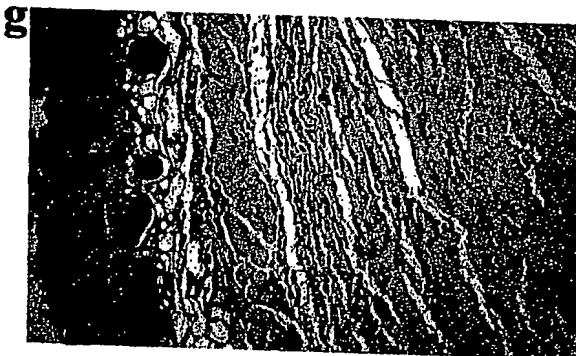
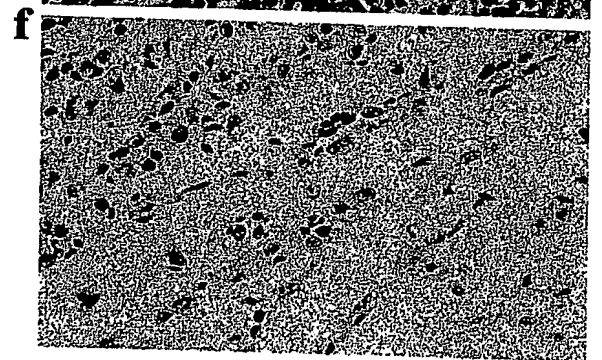
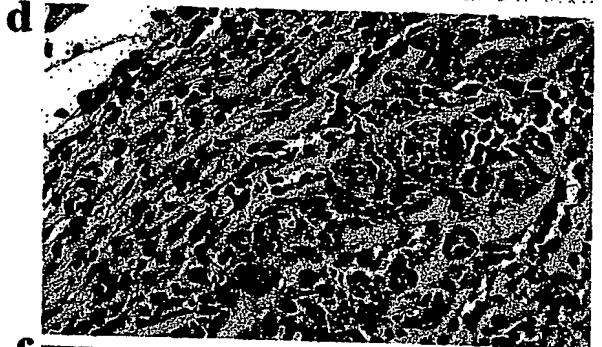
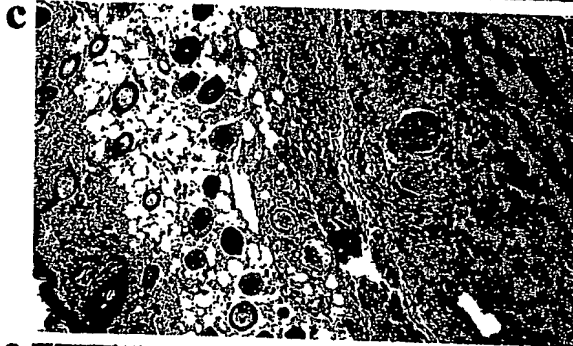
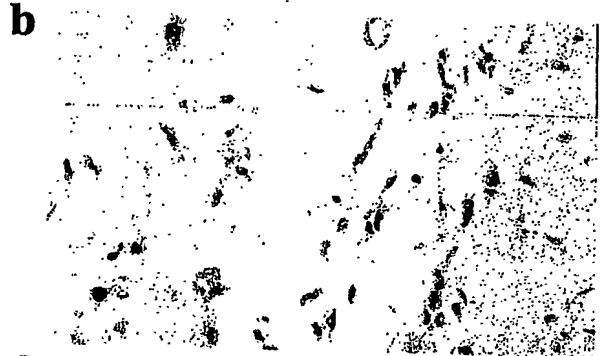
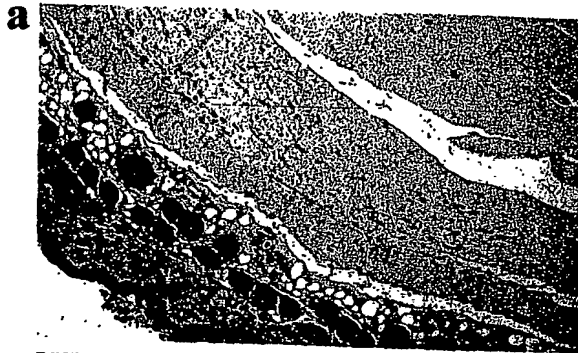


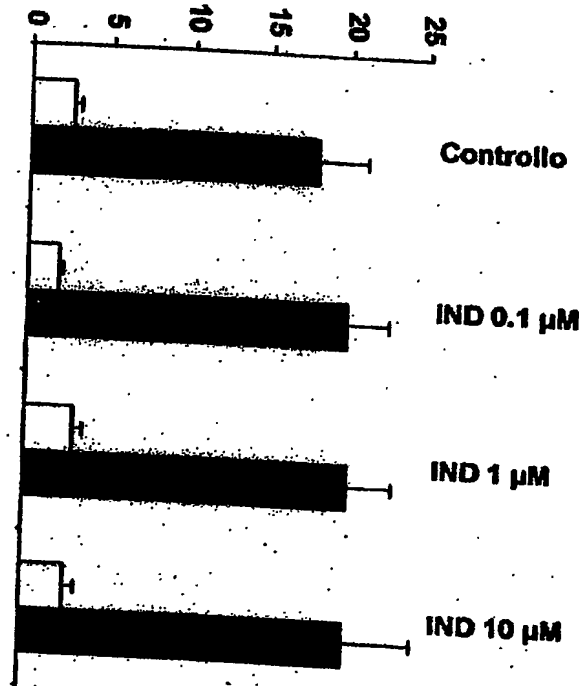
Figura 1B

2770PT1T

Tavola 3 di 11

RM 2001 A 000210

Proliferazione (cellule $\times 10^{-4}$)



Proliferazione (cellule $\times 10^{-4}$)

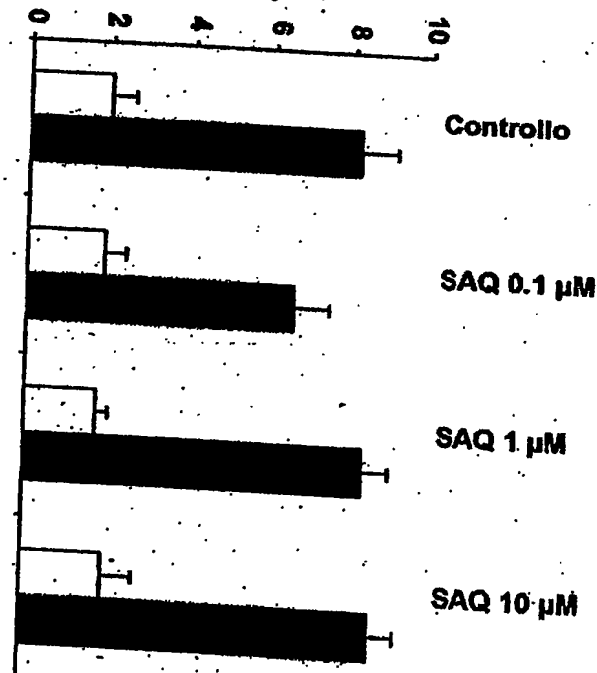
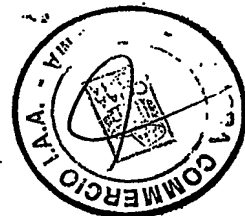


Figura 2

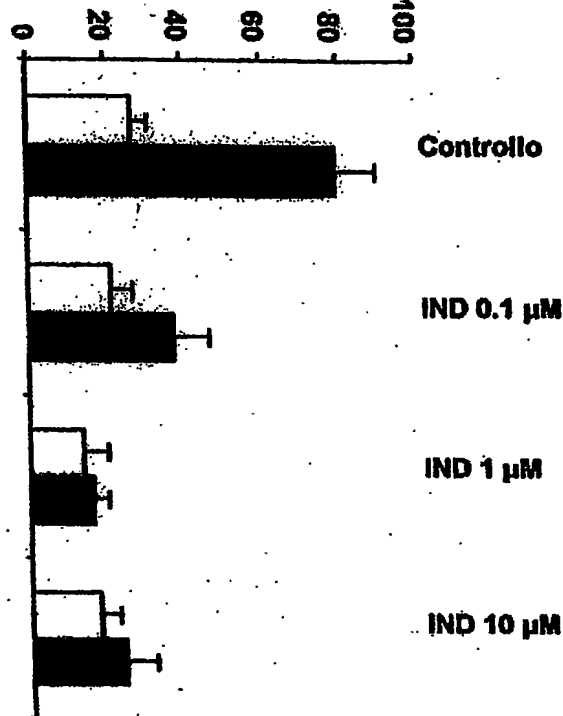


2770PTIT

Tavola 4 di 11

RM2001 A 000210

Migrazione cellulare
(numero di cellule/campo)



Migrazione cellulare
(numero di cellule/campo)

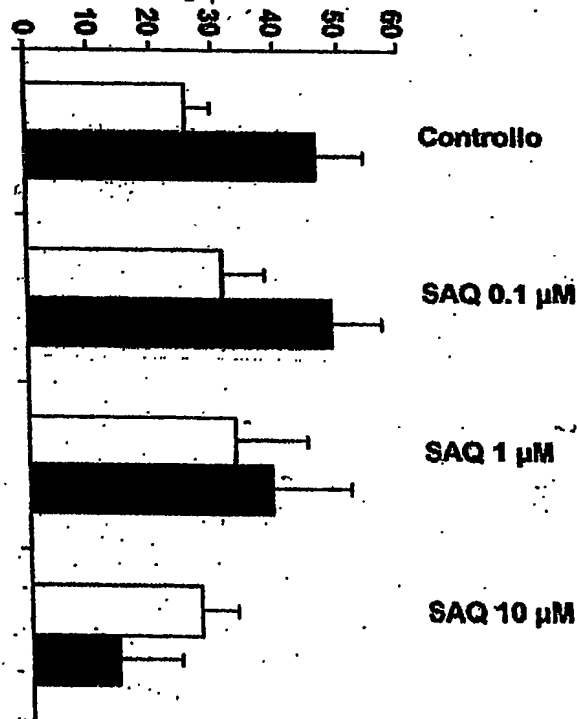
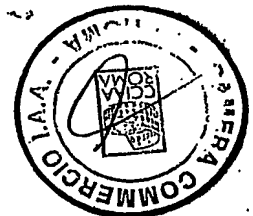


Figura 3



2770PTIT

Tavola 5 di 11

RM2001 A 000210

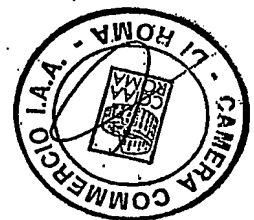
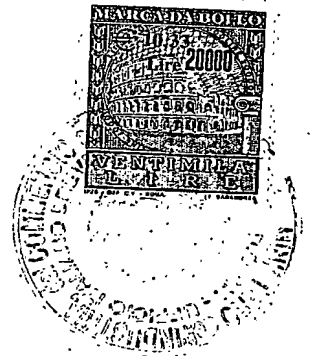
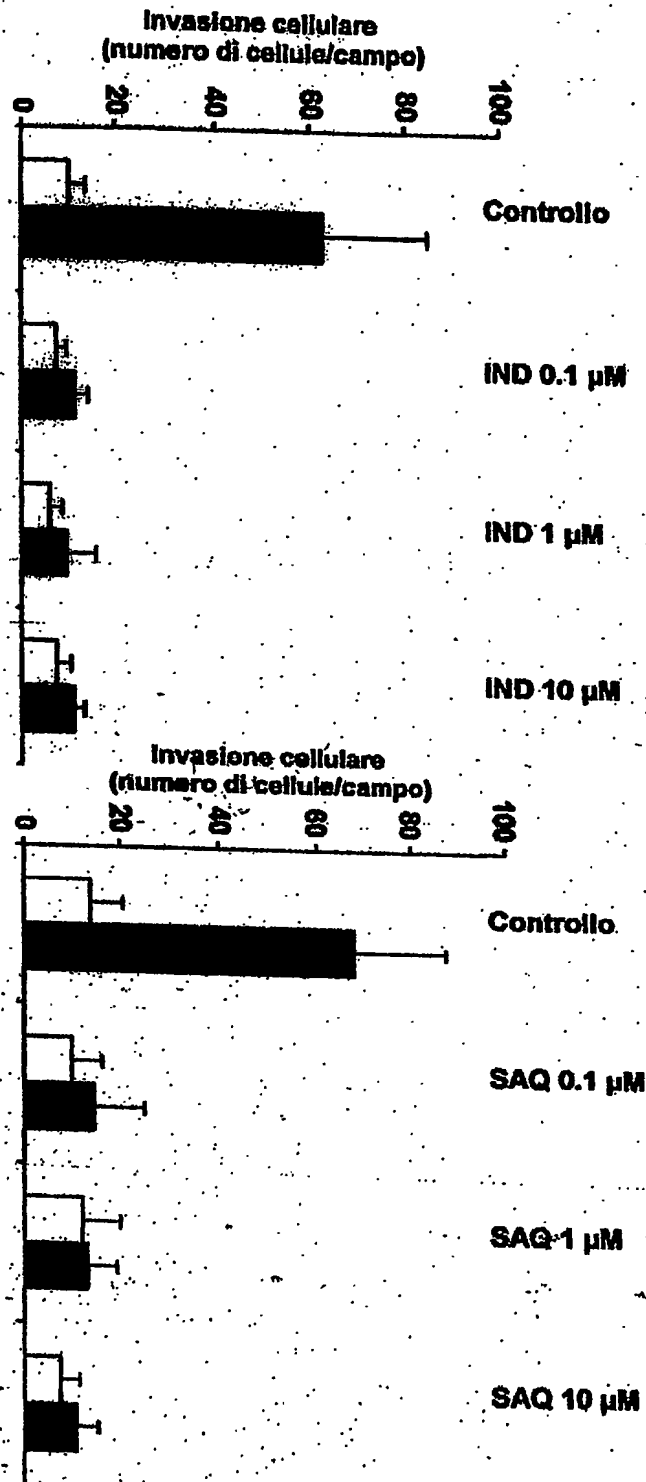


Figura 4

RM 2001/A 000210

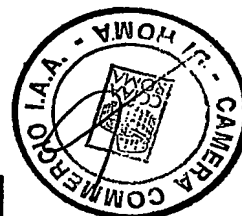
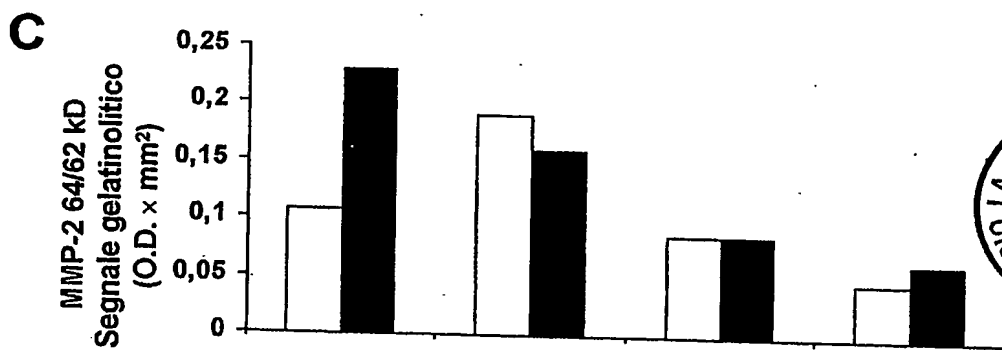
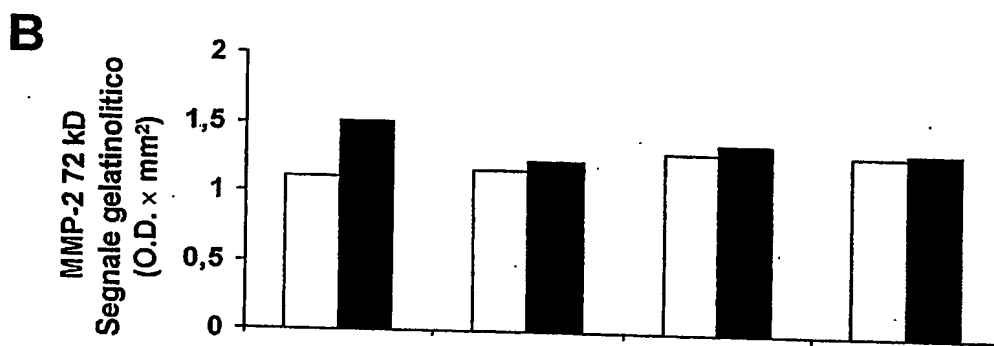
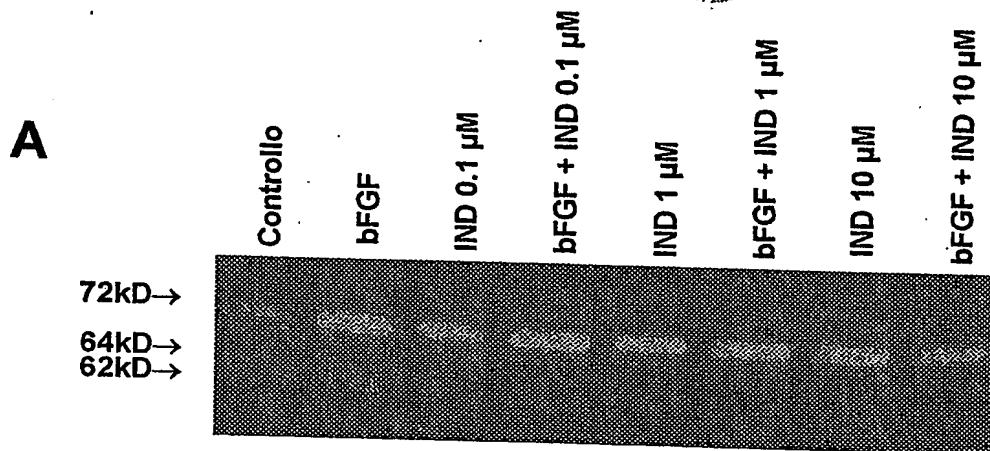


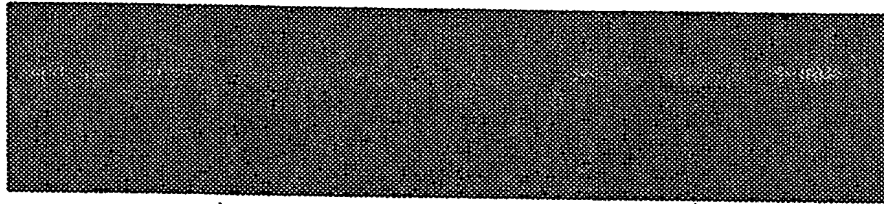
Figura 5

2770PTIT

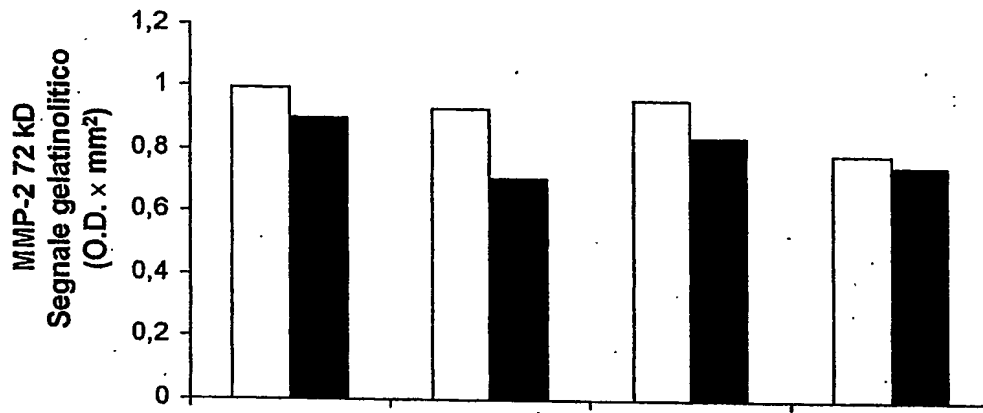
Tavola 7 di 11

A

Controllo
bFGF
SAQ 0.1 μ M
bFGF + SAQ 0.1 μ M
SAQ 1 μ M
bFGF + SAQ 1 μ M
SAQ 10 μ M
bFGF + SAQ 10 μ M



B



C

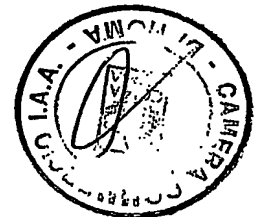
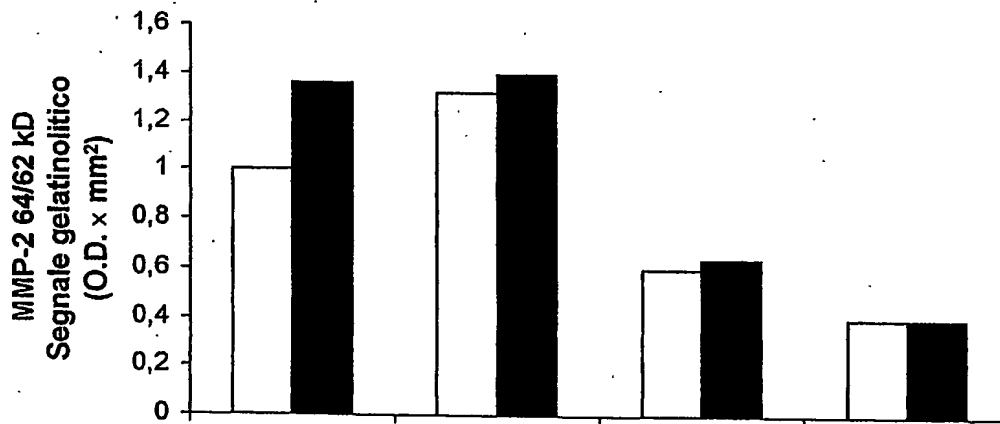


Figura 6

RM 2001 A 000210

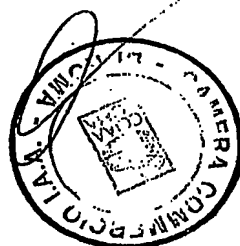
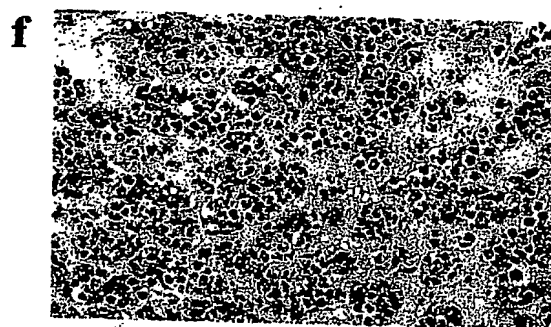
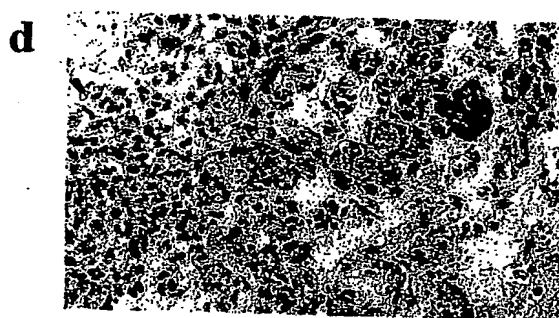
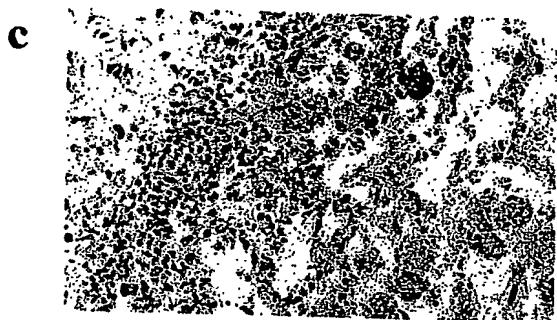
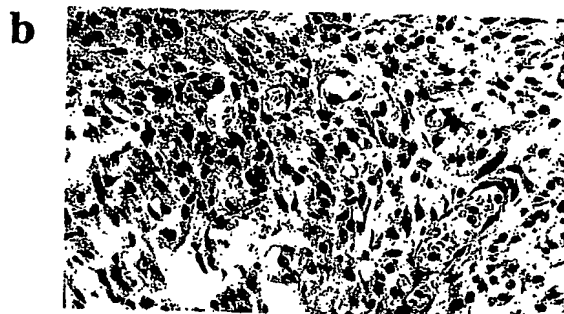
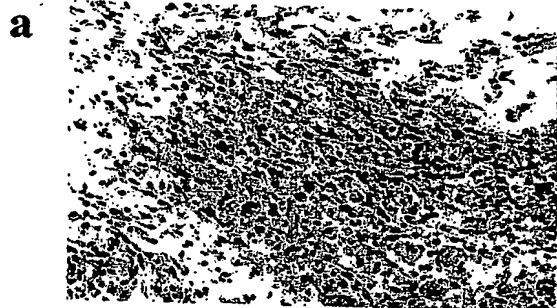
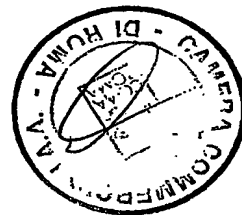
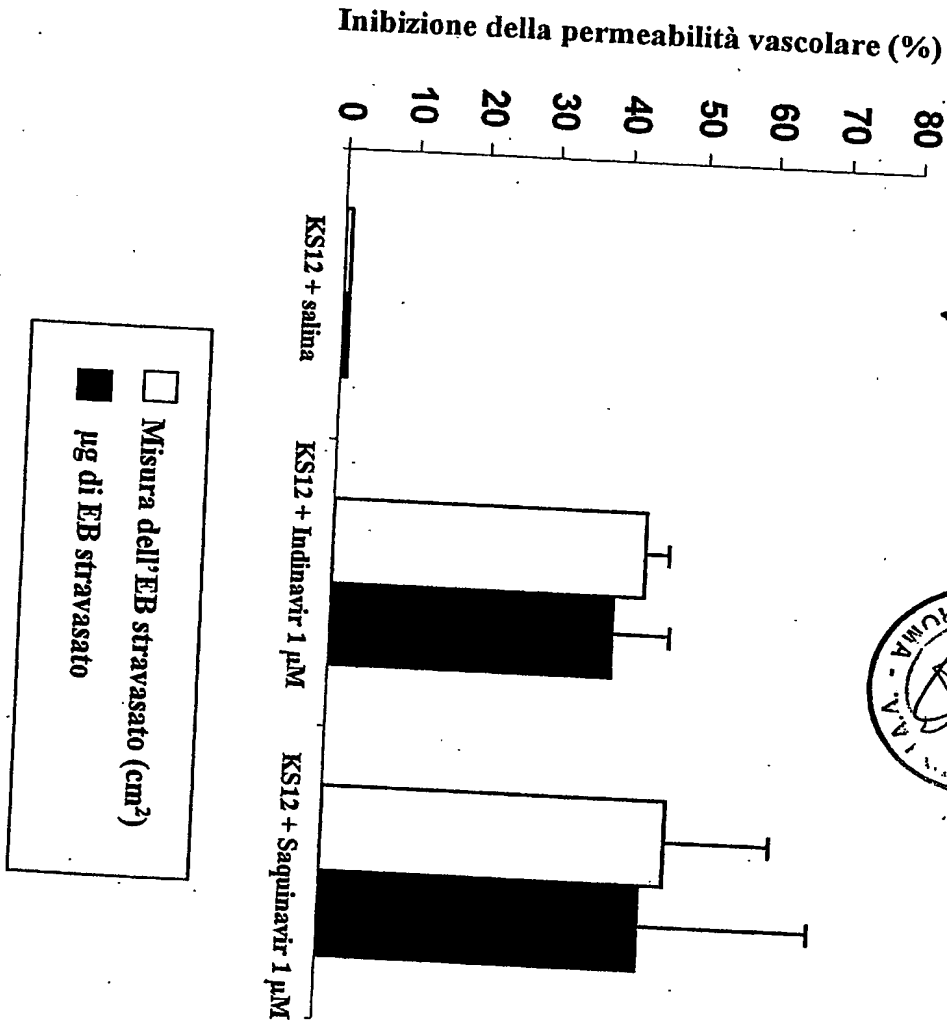


Figura 7

2770PTIT

Tavola 9 di 11

RM2001 A 000210



RM2001 A 000210

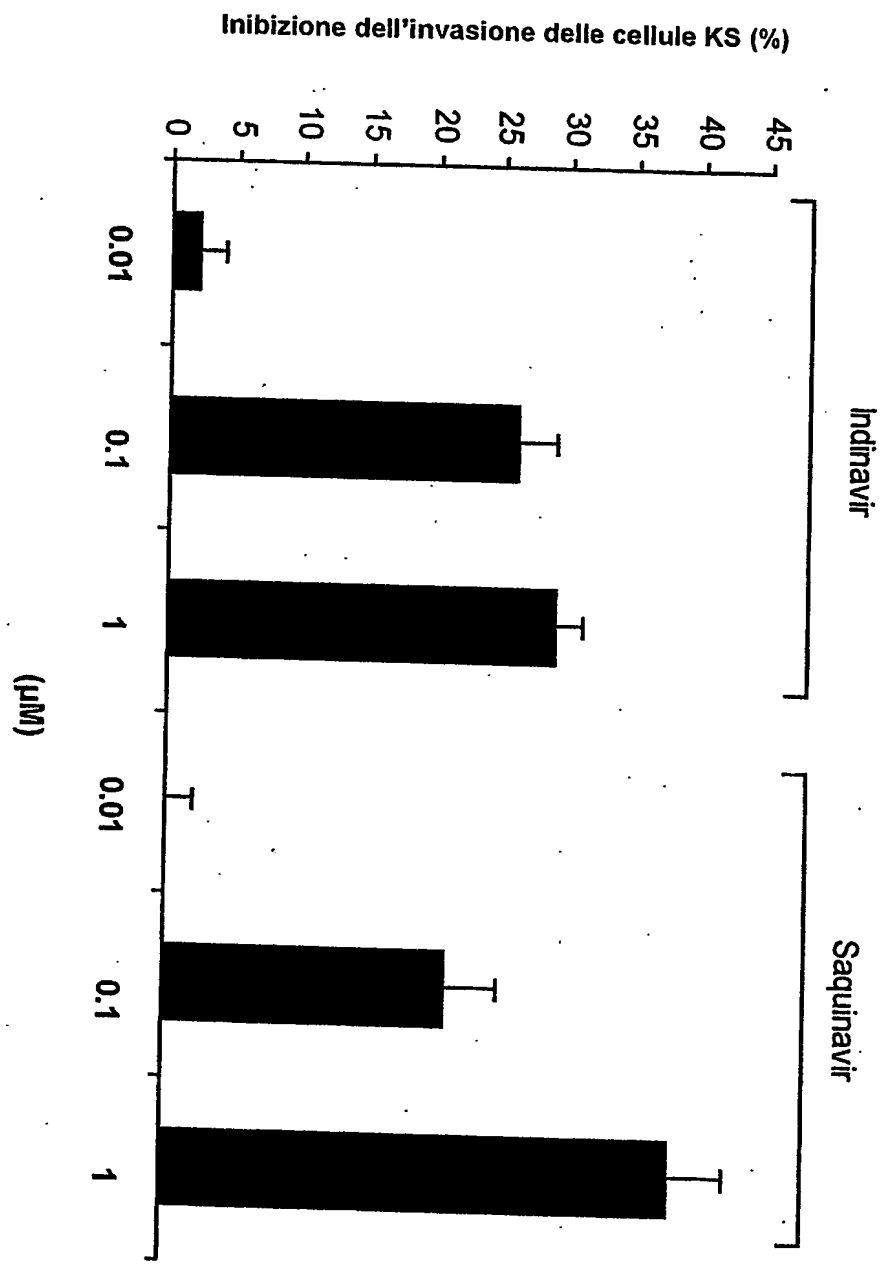


Figura 9

RM 2001 A 000210

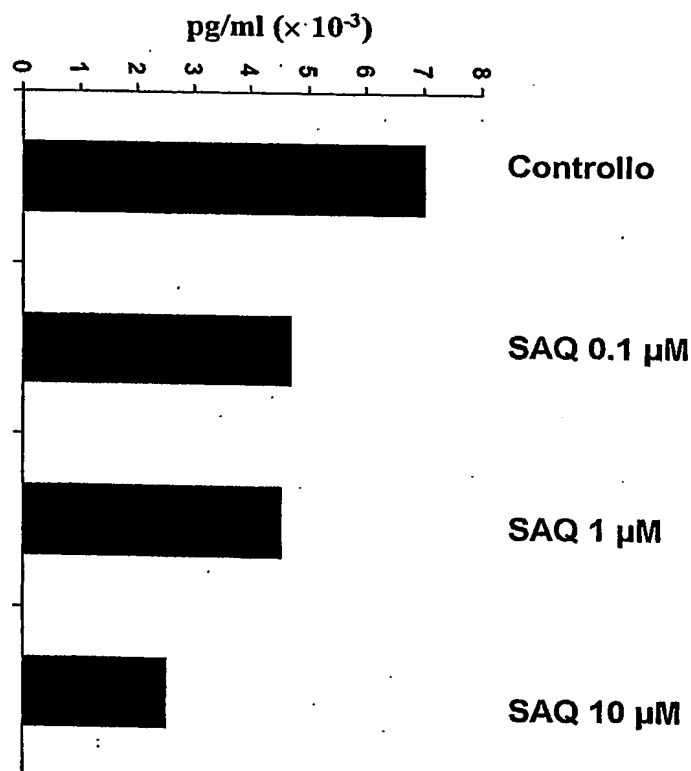
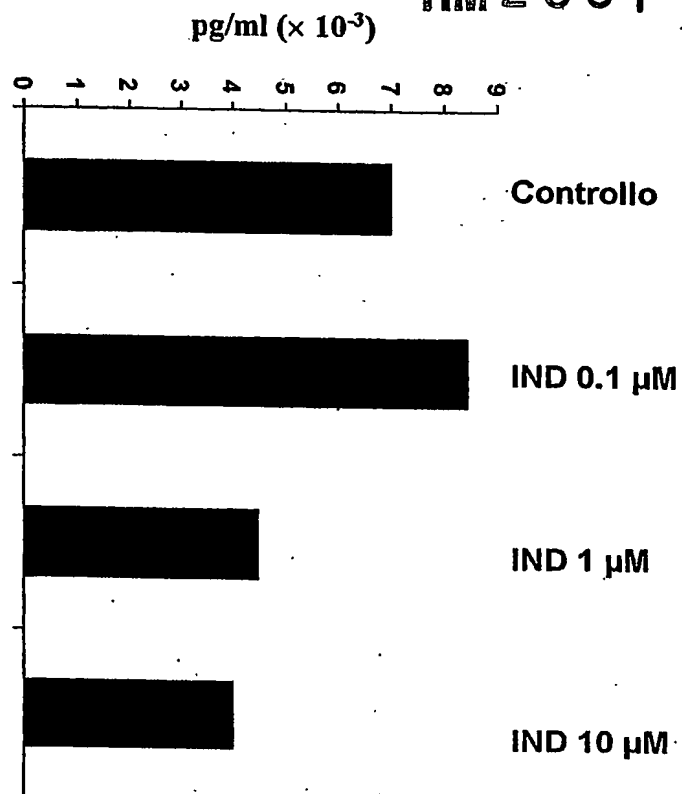
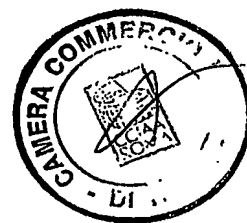


Figura 10



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.